

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***INULA VISCOSA* BİTKİ EKSTRAKTININ SAĞLIKLI VE KANSER HÜCRE
HATLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nalan TAVŞANLI

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ARALIK 2021

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***INULA VISCOSA* BİTKİ EKSTRAKTININ SAĞLIKLI VE KANSER HÜCRE
HATLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Nalan TAVŞANLI
(191297056001)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER

ARALIK 2021

BTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 181297056001 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Nalan TAVŞANLI, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*INULA VISCOSA* BİTKİ EKSTRAKTININ SAĞLIKLI VE KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER**
Bursa Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL**
Bursa Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Deniz ÖZKAN VARDAR
Lokman Hekim Üniversitesi

Teslim Tarihi :
Savunma Tarihi : 15 Aralık 2021



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Nalan TAVŞANLI

İmzası:

X

ÖNSÖZ

Bilimsel hayata adım attığım andan itibaren bilimsel bakış açısıyla, deneysel tecrübe ve birikimi ile, lisansüstü eğitimim sırasında aldığım dersler ve tez sürecimde bana katkısını ve desteğini hiç esirgemeyen bu süreci en az benim kadar özverili ilerleten sayın tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Gökçe Taner'e,

Bu tez çalışmasında kullanılan yöntemlerin temelini ve farklı deneysel bakış açılarını bana kazandırdığı ve kazandırırken gösterdiği sabır ve güler yüzlülüğü için Biyoteknoloji doktora öğrencisi sayın Çiğdem İnci Aydemir'e,

Deneyler sırasında ihtiyacım olduğu her an koşup gelen ve bana her türlü desteği sağlayan değerli arkadaşlarım Betül Mutlu ve Nagihan Nizam'a,

Sadece bu süreçte değil eğitim-öğretim hayatımın başından beri bana olan desteklerini hiçbir şekilde esirgemeyen, maddi ve manevi anlamda en yüksek fedakarlığı gösteren canım ailem Necati ve Vildan Filiz'e,

Kariyer gelişimim konusunda beni cesaretlendirip her türlü desteği ve ortamı bana sağlayan eşim Ömer Faruk Tavşanlı'ya,

Her türlü altyapı, imkan ve desteği sunan Bursa Teknik Üniversite'si idari ve akademik personeline,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2021

Nalan Tavşanlı

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
SEMBOLLER	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1 Tıbbi Bitkilerin Geleneksel Tıpta Kullanımı	3
2.2 Tıbbi Bitkiler ve Kanseri	4
2.2.1 Kanseri	4
2.2.1.1 Kanseri oluşum ve gelişim mekanizması	4
2.2.1.2 Kanser sebepleri olan etkenler	5
2.2.1.3 Akciğeri kanseri	5
2.2.1.4 Kanseri tedavisinde uygulanan yöntemler	5
2.2.2 Tıbbi bitkilerin kanseri tedavisinde kullanımı	6
2.2.2.1 Antikanser karakteristik gösteren bazı bitkiler ve bitkisel ajanlar	7
2.3 <i>Inula viscosa</i> Bitkisi	11
2.3.1 <i>Inula viscosa</i> bitkisi ile ilgili genel bilgiler	11
2.3.2 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin kimyasal bileşenleri	12
2.3.3 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin çeşitli kanseri türleri üzerinde sitotoksik, genotoksik ve antikanser etkisini araştıran çalışmalar	13
2.4 Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler ..	16
2.4.1 Nötrali kırmızı alım (NKA) yöntemi	16
2.4.2 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromid (MTT) yöntemi	17
2.4.3 Tek hücre jel elektroforezi (Comet) yöntemi	17
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1 Kimyasal Maddeler	20
3.2 Araç ve Gereçler	20
3.3 <i>Inula viscosa</i> Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması ve Kullanılan Çözeltiler	21
3.3.1 <i>Inula viscosa</i> Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	21
3.3.2 NKA yönteminde kullanılan çözeltiler	22
3.3.3 MTT yönteminde kullanılan çözeltiler	22
3.3.4 Comet yönteminde kullanılan çözeltiler	23
3.4 Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerin Belirlenmesi	24
3.4.1 NKA yöntemi ile sitotoksik etkisinin belirlenmesi	24
3.4.2 MTT yöntemi ile sitotoksik etkisinin belirlenmesi	26

3.4.3 Comet yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkinin belirlenmesi	27
3.5 İstatistiksel Yöntemler.....	28
4. BULGULAR	30
4.1 Sitotoksisitenin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	30
4.1.1 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının NKA yöntemi ile sitotoksisitelerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	30
4.1.1.1 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ekstraktının NKA yöntemi ile sitotoksisitenin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	30
4.1.1.2 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin su (IVW) ekstraktının NKA yöntemi ile sitotoksisitenin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	31
4.1.2 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının MTT yöntemi ile sitotoksisitelerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	32
4.1.2.1 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ekstraktının MTT yöntemi ile sitotoksisitenin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	32
4.1.2.2 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin su (IVW) ekstraktının MTT yöntemi ile sitotoksisitenin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	33
4.1.3 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının kanserli akciğer (A549) hücreleri üzerinde antiproliferasyon etkisinin kıyaslanmasına ilişkin bulgular.....	34
4.2 Genotoksisitenin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	36
4.2.1 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının comet yöntemi ile sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) genotoksisitelerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.....	36
4.2.2 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının comet yöntemi ile kanserli akciğer hücrelerinde (A549) genotoksisitelerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.....	39
4.3 Antigenotoksisitenin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular.....	42
4.3.1 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının comet yöntemi ile sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) antigenotoksisitelerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.....	42
4.3.2 <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının comet yöntemi ile kanserli akciğer hücrelerinde (A549) antigenotoksisitelerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.....	45
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ.....	64

KISALTMALAR

A2058	: İnsan cilt kanseri hücre hattı
A549	: İnsan akciğer kanser hücre hattı
BEAS-2B	: İnsan akciğer epitelyal hücre hattı
Colo320	: İnsan kolon kanseri hücre hattı
DMSO	: Dimetil sulfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FBS	: Fetal bovine serum
HELA	: Henritta Lacks (insan rahim ağzı kanseri hücre hattı)
HL-60	: İnsan lösemi hücre hattı
HTC116	: İnsan kolon kanseri hücre hattı
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IC₅₀	: %50 inhibisyon konsantrasyonu
I.viscosa	: Inula viscosa
IVM	: Inula viscosa metanol ekstraktı
IVW	: Inula viscosa su ekstraktı
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
LMPA	: Düşük erime noktalı agar
MCF-7	: Meme kanseri hücre hattı
MDA-MB231	: Meme kanseri hücre hattı
MTT	: 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2-tetrazolyumbromür
Na₂EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu
NaOH	: Sodyum hidroksit
NK	: Nötral kırmızısı
NKA	: Nötral kırmızı alım
NMPA	: Normal melting point agarose
NO	: Nitrit oksit
MeWo	: Cilt kanseri hücre hattı
PBS	: Phosphate buffer saline

ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SİHA	: Serviks kanser hücre hattı
T98-G	: Glioblastoma hücre hattı
TOPO-1	: Topoizomeraz-1
VEGF	: Damarsal endotelyal büyüme faktörü
WHO	: Dünya sağlık örgütü



SEMBOLLER

g	: Gram
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Antikanser aktivite gösteren tıbbi bitkiler ve kimyasal bileşenleri	8
Çizelge 4.1: NKA ve MTT testi ile belirlenen IC ₅₀ değerleri.....	35
Çizelge 4.2: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular	37
Çizelge 4.3: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının kanserli akciğer hücrelerinde (A549) DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular	40
Çizelge 4.4: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular	43
Çizelge 4.5: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen kanserli akciğer hücrelerinde (A549) DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular.	46

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 4.1: NKA yöntemine göre <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ekstraktının sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücrelerinde sitotoksik etkisinin karşılaştırılması	31
Şekil 4.2: NKA yöntemine göre <i>Inula viscosa</i> bitkisinin su (IVW) ekstraktının sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücrelerinde sitotoksik etkisinin karşılaştırılması	32
Şekil 4.3: MTT yöntemine göre <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ekstraktının sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücrelerinde sitotoksik etkisinin karşılaştırılması.	33
Şekil 4.4: MTT yöntemine göre <i>Inula viscosa</i> bitkisinin su (IVW) ekstraktının sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücrelerinde sitotoksik etkisinin karşılaştırılması.	34
Şekil 4.5: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının NKA yöntemine göre kanserli akciğer (A549) hücreleri üzerinde antiproliferasyon etkisinin karşılaştırılması.	35
Şekil 4.6: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri.	38
Şekil 4.7: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri	38
Şekil 4.8: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) comet kuyruk momenti üzerine etkileri.	39
Şekil 4.9: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının kanserli akciğer hücrelerinde (A549) comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri.	41
Şekil 4.10: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının kanserli akciğer hücrelerinde (A549) comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri.	41
Şekil 4.11: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının kanserli akciğer hücrelerinde (A549) comet kuyruk momenti üzerine etkileri.	42
Şekil 4.12: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri	44
Şekil 4.13: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri.	44

Şekil 4.14: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H_2O_2 ile oksidatif hasar indüklenen sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) comet kuyruk momenti üzerine etkileri	45
Şekil 4.15: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H_2O_2 ile oksidatif hasar indüklenen kanserli akciğer hücrelerinde (A549) comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri.	47
Şekil 4.16: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H_2O_2 ile oksidatif hasar indüklenen kanserli akciğer hücrelerinde (A549) comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri.	47
Şekil 4.17: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H_2O_2 ile oksidatif hasar indüklenen kanserli akciğer hücrelerinde (A549) comet kuyruk momenti üzerine etkileri	48



INULA VISCOSA BİTKİ EKSTRAKTININ SAĞLIKLI VE KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bitki ekstraktları yüzyıllardır geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkisel kaynaklı ürünler, içerdikleri fenolik yapıdaki bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik ve antiinflamatuvar aktiviteleri gibi özellikleri sebebiyle çeşitli hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. *Inula viscosa* bitkisi, bilinen diğer adlarıyla kanser otu ya da sarı andız otu, geleneksel tıpta uzun yıllardır yer alan fakat etkinliği tam ispatlanamamış Asteraceae familyasına ait bir bitkidir. *Inula viscosa* bitkisinin özellikle antiinflamatuvar, antipiretik, antiseptik ve antiphlogistik aktiviteleri bilinmekte ve çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Fakat *Inula viscosa* gibi bitkisel ürünlere ulaşılabilirliğin kolay olması ve doğadan gelenin her zaman zararsız olacağına dair yanlış düşünceler bitkisel kaynaklı ürünlerin bilinçsiz tüketilmesine ve olası toksik etkilerin oluşmasına yol açmaktadır. Bu tez çalışmasında, *Inula viscosa* bitkisinin su ve metanol ekstraktları olmak üzere iki farklı ekstraktın sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücre hattı üzerinde olası sitotoksik ve genotoksik/antigenotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Tez çalışması kapsamında, *Inula viscosa* bitkisinin su ve metanol ekstraktlarının her iki hücre hattı üzerindeki olası sitotoksik etkileri nötral kırmızısı alım yöntemi (NKA) ve 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile belirlenmiş, hangi ekstraktın A549 hücre hattı üzerinde daha iyi antiproliferatif etki gösterdiği araştırılmıştır. Ayrıca sitotoksik etki göstermeyen konsantrasyon aralıklarında hem genotoksik etkileri hem de oksidatif hasara neden olan hidrojen peroksit (H_2O_2) karşı antigenotoksik etkileri BEAS-2B ve A549 hücre hatları üzerinde tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, her iki hücre hattında da 10-100 µg/ml konsantrasyon aralığında sitotoksik etki gözlenmezken, 250-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında sitotoksik etki gözlenmiştir. Sitotoksik etkinin gözlenmediği 10-100 µg/ml konsantrasyon aralığında, BEAS-2B hücre canlılığı A549 hücre canlılığından fazladır. Ayrıca, *Inula viscosa* bitki ekstraktlarından metanol ekstraktı A549 hücre hattı üzerinde BEAS-2B hücre hattına kıyasla daha iyi antiproliferatif etki göstermiştir. Diğer yandan, *Inula viscosa*'nın her iki hücre hattı üzerinde genotoksik etki gösterdiği, BEAS-2B hücre hattı üzerinde antigenotoksik etkinin bulunmadığı fakat A549 hücre hattı üzerinde metanol ekstraktının antigenotoksik etki gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Inula viscosa*, sitotoksisite, genotoksisite, antigenotoksisite, akciğer kanseri, comet

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF *INULA VISCOSA* PLANT EXTRACT ON HEALTY AND CANCER CELL LINES

SUMMARY

Plant extracts have been widely used in traditional medicine for centuries. Plant-derived products play an important role in treatment or prevention of various diseases due to their antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and antiinflammatory activities. *Inula viscosa* is a plant which belongs to the Asteraceae family and known as woody fleabane, sticky fleabane and yellow fleabane. It has been used in traditional medicine for many years, but its effectiveness has not been fully proven yet. The antiinflammatory, antipyretic, antiseptic and antiphlogistic activities of the *Inula viscosa* plant are known and it is used in the treatment of various types of cancer. However, the fact that herbal products such as *Inula viscosa* are easily accessible and thought that what comes from nature will always be harmless leads to unconscious consumption of herbal products and possible toxic effects. In this thesis, it was aimed to investigate the possible cytotoxic and genotoxic/antigenotoxic effects of two different extracts (water and methanol) of *Inula viscosa* plant on healty lung (BEAS-2B) and cancerous lung (A549) cell lines. Within the scope of the thesis study, the possible cytotoxic effects of water and methanol extracts of *Inula viscosa* on both cell lines were determined by neutral red uptake method (NRU) and 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 difenil tetrazolium bromid (MTT) method. Also, it was investigated which extract had a better antiproliferative effect on the A549 cell line. In addition, both genotoxic and antigenotoxic effects against hydrogen peroxide (H₂O₂), which causes oxidative damage were evaluated by single cell gel electrophoresis (Comet) at the non-cytotoxic concentrations. As a result of this study, while no cytotoxic effect was observed at the 1-100 µg/ml concentration range in both cell lines, cytotoxic effect was observed at the 250-1000 µg/ml concentration range. BEAS-2B cell viability is higher than A549 cell viability at the non-cytotoxic concentrations. Besides, methanol extract of *Inula viscosa* showed better antiproliferative effect on A549 cell line compared to BEAS-2B cell line. On the other hand, it was determined that, *Inula viscosa* had a genotoxic effect on both cell lines, no antigenotoxic effect on the BEAS-2B cell line, but methanol extract of *Inula viscosa* had an antigenotoxic effect on the A549 cell line.

Keywords: *Inula viscosa*, cytotoxicity, genotoxicity, antigenotoxicity, lung cancer, comet

1. GİRİŞ

Son yıllarda doğal ürünlerin ve tıbbi bitkilerin kullanımı, hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesi amacıyla giderek yaygınlaşmaktadır. Bitkisel ürünlerin ucuz, kolay ulaşılabilir olması ve doğal içeriklerden zarar gelmeyeceği düşüncesi, bitkilerin ve bitkisel kaynaklı ürünlerin bilinçsiz olarak kullanımını arttırmaktadır. Günümüzde antimikrobiyal, antidiyabetik, antiinflamatuvar ve antioksidan gibi özelliklere sahip çok sayıda bitkisel ajan çeşitli hastalıkları tedavi etmekte kullanılmakta ve bu bitkisel ajanlardan bazılarının deney hayvanları üzerindeki in vivo çalışmalar sonucunda tümör oluşumunu engellediği iddaa edilerek kansere karşı kullanılabileceği savunulmaktadır.

Geleneksel tıpta binlerce yıldır bitkiler ya da bitkisel kaynaklı ajanlar farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Son zamanlarda bu alternatif bitkisel ürünlerin özellikle kanser üzerine olan etkilerinin araştırılması ve geliştirilmesi için birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre, bazı bitkilerin sağlık üzerinde olumsuz etkilere sahip olabileceği ya da diğer kullanılan ilaçlarla etkileşime girme potansiyeline sahip olabilecekleri de bildirilmektedir. Buna rağmen bu tür bitkilerin sağlık için potansiyel riskleri hakkında çok az bilgi mevcuttur. Bu bitkilerin geleneksel tıpta ilaç olarak insanlar tarafından uzun süreli kullanımlarına bağlı olarak, insan vücudunda düşük toksik etkiye sahip olabileceği unutulmamalıdır. Birçok çalışma, antioksidan etkili fenolik bileşiklerin düşük konsantrasyonlarda antioksidan etki gösterirken aynı bileşiğin yüksek konsantrasyonda prooksidan etki gösterebileceğini öne sürmektedir. Bazı bitkisel kaynaklı bileşiklerin yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda sitotoksik, genotoksik veya mutajenik etkilerinin bulunduğu ortaya konulsa da bunun tersini içeren çalışmalar da mevcuttur. Fenolik yapıdaki bitkisel bileşiklerin kimyasal ve farmakolojik etkilerinin bilinmesi, insan sağlığını tehdit eden olası riskleri ve/veya istenmeyen etkilerinin ortaya çıkarılması ve bileşiklerin uygun konsantrasyonlarda kullanımının sağlanması için daha ayrıntılı çalışmalara gerek duyulmaktadır (Balasundram ve diğ, 2006; Bacanlı ve diğ, 2015).

Dünyanın birçok yerinde geleneksel olarak kullanılan bitkilerden biri de kanser otu ya da yapışkan andız otu olarak bilinen *Inula viscosa* bitkisidir. *Inula viscosa*, Akdeniz havzasında doğal ortamda yetişen, güçlü bir kokuya sahip, aromatik, Asteraceae familyasına ait çok yıllık yabani bir ottur. *Inula viscosa*'nın, geleneksel tıpta yıllardır antiinflamatuvar, antipiretik, antiseptik ve antiphlogistik aktiviteleri bilinmekte ve özellikle kanser hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Al-Eisawi, 1998).

Bu tez çalışmasının amacı, alternatif tıpta önemli bir yeri olan ancak sağlık üzerindeki etkisi halen tam olarak ortaya konulamamış olan *I.viscosa* bitkisinin normal ve kanserli akciğer hücre hatları üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik etkisini incelemektir. Literatür araştırmaları doğrultusunda bu hücreler üzerindeki etkiler hakkında bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu doğrultuda, *I.viscosa* bitkisinin hem su hem de metanol ekstraktlarının hazırlanması, BEAS-2B ve A549 hücre hatları üzerinde sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik etkileri incelenerek, akciğer kanseri üzerinde önleyici veya tedavi edici etkiye sahip olup olmadığı ve hangi bitki ekstraktının A549 hücre hattı üzerinde daha iyi antiproferatif etki gösterdiği araştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada olası sitotoksik etkiler nötral kırmızısı alım yöntemi (NKA) ve 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile belirlenmiş, sitotoksik etki göstermeyen konsantrasyonlarda hem genotoksik etkilerinin hem de oksidatif hasara neden olan hidrojen peroksit (H_2O_2) karşı antigenotoksik etkileri tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi ile araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 Tıbbi Bitkilerin Geleneksel Tıpta Kullanımı

Tıbbi bitkiler ve doğal ürünler, bireylerin mevcut sağlık durumlarının korunması, görülen hastalıkların önlenmesi veya tedavi edilmesi gibi sebeplerden dolayı yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Bacanlı ve diğ, 2015). Bitkiler, biyolojik olarak aktif kimyasalların ana kaynakları arasında sayılmaktadır. Avrupa ve ABD'deki reçeteli ürünlerin yaklaşık %50'sinin doğal ürünleri veya bunların türevlerini içerdiği tahmin edilmektedir. Ancak, Dünyadaki 500.000'e yakın bitki türünden sadece %1-10'unun kimyasal ve farmakolojik olarak potansiyel tıbbi özellikleri bilinmektedir (Talib ve Mahasneh, 2010). Diğer yandan bu tür bitkiler bazı durumlarda olumsuz etkilere sebep olabilir veya diğer ilaçlarla birlikte tüketildiği takdirde etkileşime girebilirler. Son yapılan araştırmalar, gıda olarak tüketilen veya geleneksel tıpta kullanılan birçok bitkinin in vitro ve in vivo deneylerde mutajenik, sitotoksik ve genotoksik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Çelik ve Aslantürk, 2010).

Kimyasal ve farmakolojik etkileri bilinmeyen bitkilerin yanısıra, sayıca az bir kısmının medikal uygulama alanları bilinmektedir. *Teucrium polium* (acı yavşan), *Phagnalon rupstre* (kaya bozçalısı) ve *Inula viscosa* (kanseri otu, yapışkan andız otu) gibi bitkiler kanser ülser, diyabet, böbrek taşları, iltihaplar, romatizma ve kas gevşemesi gibi hastalıkları hafifletmek için reçete edilir (Talib ve Mahasneh, 2010).

Antimikrobiyal, antidiyabetik, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip olduğu düşünülen bitkisel etkin maddeler günümüzde çeşitli hastalıklara karşı tedavi edici olarak kullanılmakta dahası bazı bitkisel kaynaklı maddelerin yapılan hayvan deneyleri sonucunda tümör inhibisyon özelliğine sahip oldukları iddaa edilerek kansere karşı antikanser ilacı olarak kullanılabilecekleri savunulmaktadır (Balasundram ve diğ, 2006).

2.2 Tıbbi Bitkiler ve Kanser

2.2.1 Kanser

Kanser, dünyada hastalık ve ölüm oranlarının artışına sebep olan nedenler arasında oldukça dikkat çeken bir hastalıktır. Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci önde gelen ölüm nedeni olup dünya genelinde sekiz ölümün birinden sorumludur. Küresel olarak, kanser ölümlerinin sayısının 2030 tarihi itibarıyla 11,5 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir (Desai ve diğ, 2008).

2.2.1.1 Kanser oluşum ve gelişim mekanizması

Kanser, normal büyüme özelliklerini kaybetmiş hücrelerin sayıca artmasıyla gelişen genetik hastalıklar arasında görülme oranı en yüksek ve en karışık mekanizmaya sahip olan hastalık türüdür. Batı dünyasında her üç kişiden birinde kanser gelişmekte olup her beş kişiden biri gelişen kanser yüzünden yaşamını yitirmektedir (Yokuş ve diğ, 2012).

DNA dizisinde bulunan anormalliklerin (mutasyonlar) kanser oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir. Yaşam boyunca, mutajenlere maruz kalan insan hücrelerindeki DNA, replikasyon sırasında hatalarla karşılaşır, bu da her hücrenin DNA dizisinde ilerleyici, güç farkedilebilen değişikliklere yani mutasyonlara neden olur. Bazen, bu somatik mutasyonlardan biri, içinde bulunduğu hücreye bir büyüme avantajı sağlayan ve bu hücreden türetilen genişletilmiş bir klonun ortaya çıkmasına neden olan kritik bir genin işlevini değiştirir. İlgili hedef genlerdeki ek mutasyonlar ve bunun sonucundaki klonal genişleme dalgaları, çevre dokuları istila eden ve metastaz yapan hücreler üretir (Futreal ve diğ, 2001).

Kanser gelişim evresinde tümör hücreleri sayıca birden çok ve çeşitli fenotipik özellikler kazanır. Bu kazanılan özellikler tümör hücrelerine sınırsız bölünme ve yayılma avantajı verirken diğer dokuları da rahatlıkla istila etme fırsatı yaratır. Böylelikle, kanser hücreleri bulundukları özgün çevre dışında bağımsız hareket etme yetenekleri elde ederek diğer dokular üzerinde de etkilerini sürdürebilirler (Doğan ve Güç, 2004).

2.2.1.2 Kansere sebep olan etkenler

Kanser multifaktöriyel bir hastalık olup oluşum sebepleri arasında bakteriler, virüsler, zararlı alışkanlıklar, radyasyon, kalıtım, çevresel faktörler, kimyasallar gibi bir çok etken kanser oluşumuna sebebiyet vermektedir. Bu faktörler arasında kalıtım yoluyla kanserin oluşum oranı çevresel faktörlerin sebep olması oranına göre daha azdır. Ancak iki etkinin birleşimi kansere yakalanma olasılığını tetikleyebilmektedir. Örneğin, tümör gelişimini önleyen tümör baskılayıcı genlerdeki genetik hasarın kalıtım yoluyla aktarılmasının yanısıra sigara gibi bir kanserojenin bu hasara ilave olarak tüketilmesi bireylerin kansere yakalanma potansiyellerini arttırabilmektedir (Yokuş ve diğ, 2012).

2.2.1.3 Akciğer kanseri

Akciğer kanseri, Dünya’da; erkekler arasında en sık rastlanan, kadınlar arasında ise görülme sıklığı açısından üçüncü sırada yer alan kanser türüdür. Bu kanser türünün ortaya çıkmasında genetik ve çevresel faktörler etkilidir. Sigara, akciğer kanserine yakalanma olasılığını %80-90 oranında arttırmaktadır. Alkol başta olmak üzere, arsenik içeren içme suyunun tüketilmesi ve beta-karoten takviyelerinin yüksek konsantrasyonlarda alınması akciğer kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır. Ayrıca, kırmızı et ve işlenmiş etin çokça tüketilmesinin akciğer kanseri riskini arttıracığına dair çalışmalar mevcuttur (IARC, 2018).

2.2.1.4 Kanser tedavisinde uygulanan yöntemler

Kemoterapi, kanser tedavisinde rutin olarak kullanılan yöntemdir. Kanser hücreleri normal hücrelerde bulunan düzenleyici fonksiyonların çoğundan yoksun oldukları için, bölünmelerinde engel tanımazlar. Bu özellik kanser hücrelerini kemoterapötik ilaçlara karşı duyarlı hale getirir. Bu durum sistemik olarak ilaç keşfi ve gelişimine katkı sağlanmış olup kemoterapötik ilaç koleksiyonunun oluşumunu sağlamaktadır. Ancak, sağlanan bu çeşitlilik kemoterapötik yöntemin kendi içinde problemler yaşamasının önüne geçememiştir. Kemoterapötik tedavilerin bir sonucu olarak organ toksisiteleri ve sitemik toksisite oluşabilir. Kardiyotoksisite, böbrek toksisitesi, mesane toksisitesi ve miyelotoksisite kemoterapötik tedavilerde kullanılan ajanların sebep olduğu toksisitelerdir (Fraiser ve diğ, 1991; Desai ve diğ, 2008).

Kemoterapötik ilaçların toksisitesi kanser tedavisinde önemli bir sorun yaratır. Bu problemin üstesinden gelmek üzere çeşitli kanser tedavi yöntemleri öne sürülmüştür. Öne sürülen tedavi yöntemlerinin birçoğu bitkisel kaynaklı maddelerden oluşur. Çünkü, bitkiler yeni ilaçlar sağlama konusunda muazzam bir potansiyele sahiptir ve bu nedenle kansere karşı kemoprotektif potansiyel sağlayabilen doğal kimyasallar deposudur (Taneja ve Qazi, 2007).

2.2.2 Tıbbi bitkilerin kanser tedavisinde kullanımı

Birçok kanser türünde, tedavide kullanılan tam anlamıyla etkili bir ilaç yoktur. Bundan dolayı, etki seviyesi yüksek, düşük toksisiteye sahip ve çevre üzerinde minimum kötü etkiye sahip olan yeni ilaçlara genel bir ihtiyaç vardır. Yeni doğal ürünler, ilaç keşfinde fırsatlar sunmaktadır (Cai ve diğ, 2004). Uzun yıllardır yapılan pek çok çalışmada doğal ürünlerin kanser önleme ve kanser tedavisinde önemli bir rol oynadığı ortaya konmaktadır. Hali hazırda klinikte kullanılan önemli sayıda antitümör ajanı doğal kökenlidir. Örneğin, 1940 ve 2006 yılları arasında uluslararası olarak onaylanan antikanser reçeteli ilaçların yarısından fazlasını doğal ürünler veya bunların türevleri oluşturmaktadır. Bu doğal ürünler arasında da özellikle bitkiler tıp için kullanılan etken bileşiklerin ana kaynağı olmuştur. 1960'lar boyunca, Ulusal Kanser Enstitüsü (ABD) 20 ülkeden antitümör aktivitesine sahip yaklaşık 114.000 bitki ekstraktını araştırmaya başlamıştır. O zamandan bu yana, tıbbi bitkilerden izole edilen doğal bileşikler yeni antikanser ilaçları için zengin içerik (fenolik bileşikler, organik asitler, taninler, antosiyaninler ve flavonoidler gibi) barındırmasından dolayı artan ilgi kaynağı haline gelmiştir. ABD'de 1983'ten önce ve 1983-1994 yılları arasında dünya çapında onaylanmış antikanser ilaçları arasında ticari olarak satılan 92 antikanser ilacının %60'ı doğal kökenlidir (Desai ve diğ, 2008; Shoeb, 2008).

Geleneksel şifalı bitkiler Doğu Asya'da örneğin Çin, Japonya, Hindistan, Tayland gibi birçok ülkede birkaç bin yıldır hastalıklara karşı farmakolojik olarak ve diyetle ilave olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Geleneksel şifalı bitkilerin halk tarafından uzun süreli uygulanması sırasında birçok şifalı bitki ve bununla ilgili olan birçok reçete taranmış olup çeşitli kanserlerin tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmıştır (Cai ve diğ, 2004; Desai ve diğ, 2008).

Birçok çalışma, bitkilerin antikarsinojenik özellikleri üzerine odaklanmıştır. Antikanserojenik özellik gösteren bazı bitkiler şunlardır: *Anacardium occidentale* karaciğer tümörlerine (hepatom) karşı, *Asparagus racemosus* insan epidermal kanserlerine karşı, *Boswellia serrata* nazofranjit insan epidermal kanserlerine karşı, *Erthyria suberosa* sarkom oluşuma karşı, *Euphorbia hirta* lösemiye karşı, *Nigella sativa* ve *Inula viscosa* akciğer kanserine karşı, *Withania somnifera* ise birçok kanser türüne karşı antikarsinojenik etki göstermektedir (Desai ve diğ, 2008; Talib ve diğ, 2012).

2.2.2.1 Antikanser karakteristik gösteren bazı bitkiler ve bitkisel ajanlar

İnsan vücudunda gerçekleşen çok sayıdaki fizyolojik ve biyokimyasal süreç, yan ürünler olarak oksijen merkezli serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türlerini üretebilmektedir. Bu tür serbest radikallerin aşırı üretimi lipidler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara neden olabildiği gibi diyabet, yaşlanma, kanser, dejeneratif hastalıklar gibi birçok kronik rahatsızlığa da yol açabilmektedir (Halliwell, 1994; Niki, 1997; Poulson ve diğ, 1998).

Bitkiler (meyveler, sebzeler, tıbbi bitkiler vb.); fenolik bileşikler (örneğin; fenolik asitler, flavonoidler, kinonlar, kumarinler, lignanlar, stilbenler, tanenler), nitrojen bileşikler (alkanoidler aminler, betalainler), vitaminler, terpenoidler (karotenoidler dahil) ve antioksidan aktivite açısından zengin diğer endojen metabolitler olmak üzere çok çeşitli serbest radikal tutucu moleküller içerebilmektedir (Cotelle ve diğ, 1996; Zheng ve Wang, 2001; Cai ve diğ, 2003,2004).

Günümüzde, çoğu kanser türünü tedavi eden etkili ilaçlar bulunmamaktadır; bunun yanı sıra kanser tedavisinde kullanılan yöntemler oldukça pahalıdır. 1960'dan bu yana Ulusal Kanser Enstitüsü (ABD), antitümör aktivitesi olan bitki özlerini araştırmaya başlamıştır. Yeni antikanser ilaçların zengin kaynaklarını barındıran şifalı bitkiler ve bu bitkilerden izole edilen doğal bileşikler, o zamandan itibaren artan bir çalışma alanına sahip olmuştur (Cai ve diğ, 2004).

Antikanser aktivite gösteren bazı tıbbi bitkiler ve içeriğinde bulunan temel kimyasal bileşenleri Çizelge 2.1' de özetlenmiştir (Desai ve diğ, 2008).

Çizelge 2.1: Antikanser aktivite gösteren tıbbi bitkiler ve kimyasal bileşenleri

Bitki Adı	Bitkinin Ana Kimyasal Bileşenleri	<i>In Vitro</i> Etkileri	<i>In Vivo</i> Etkileri
<i>Tinospora cardifolia</i>	20 β -hidroksiekdisteron, Kordiosid, Kolombin	HeLa hücrelerinde sitotoksiktir.	Ehrlich ascites karsinomalı farelerde önemli tümör gerilemesi ve hayatta kalma
<i>Ziziphus nummularia</i>	Betulin, Betulinik asit	a. Sitotoksiktir ve normal hücrelere göre kanser hücrelerine seçici olarak etki eder. b. ROS üretimi yoluyla apoptozu indükler. c. Anjiyogenezi inhibe eder, transkripsiyonel aktivatörleri modüle eder. d. Mitokondrial membran potansiyelinin kaybını indükler.	
<i>Andrographis paniculata</i>	Andrografolit	Alkol ekstraktı, kanser hücre hatlarından oluşan bir panale karşı sitotoksik aktivite göstermiştir.	Andrographolide farelerde tümörü geriletir.

Çizelge 2.1 (devam): Antikanser aktivite gösteren tıbbi bitkiler ve kimyasal bileşenleri

<i>Centella asiatica</i>	Asiatikosit, hidroksitolin, valerin, pektik asit, sterol, stigmasterol, flavonoidler, tenkunositler ve askorbik asit	a. <i>C. Asiatica</i>’nın yaprak ekstraktı transforme edilen hücre hatlarını doza bağlı olarak inhibe eder. b. DNA sentezinin inhibisyonuna bağlı anti-tümör aktivitesi gösterir.	
<i>Curcuma longa</i>	Kurkumin	a. Çok çeşitli hücre hatlarında hücre proliferasyonunu inhibe eder. b. Mitokondril membran potansiyelini azaltarak in vitro apoptozu indükler.	a. VGEF ve bFGF aracılı anjiyogenezi azaltır. b. Kemirgenlerde kolon ve mide kanserini önler.
<i>Phyllanthus amarus</i>	Nirtetralin, niranthin, phyllan-thin, phyltetralin	a. Farklı kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe eder. b. <i>Sacchromyces cerviacae</i> mutant hücre kültürlerinde topoizomerez I ve II aktivitesini inhibe eder.	a. Ekstrakt oral olarak alındığında, Dalton lenfoma asitleri (DLA) VE Erlich asit karsinomu (EAC) taşıyan farelerde yaşam süresini uzatır ve tümör boyutunu küçültür. b. Bitki ekstraktı n-nitrosodiethylamine (NDEA)-ile indüklenen tümör insidansını azaltır. c. Bitki ekstraktı Lewis akciğer karsinomu taşıyan farelerde anti-anjiyogenik etkilere sahiptir.

Çizelge 2.1 (devam): Antikanser aktivite gösteren tıbbi bitkiler ve kimyasal bileşenleri

<i>Annona atemoya</i>	Bullatasin	a. Tümör hücre hatlarında sitotoksik etki gösterir. b. Kromatin marjı ve tümör hücre yoğunlaşması ile indüklenen hücre ölümüne sebep olur.	
<i>Mappia foetida</i>	Kamptotesin	a. HeLa hücreleri ve L-120 hücrelerinde etkili nükleik asit sentezi inhibitörüdür. b. Topoizomerez-1'i (topo -1) inhibe eder. c. İnsan kolon kanser hücrelerinin ve rhabdomyosarkom hücrelerinin büyümesini yavaşlatır. d. Lösemiye karşı güçlü bir kemoterapi ilacıdır.	a. Meme karsinomunun kısmi veya tam zamanlı remisyonunu indükler. b. Lenfoma, lösemi ve epitelyal tümörlere karşı Faz II denemeleri yapılmıştır.
<i>Withania somnifera</i>	Vitaferin A	a. Hızlı ROS üretimi yoluyla çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu indükler. b. Apikal ölüm reseptörlerinin upregülasyonunu sağlar ve Bcl2 protein ailesinin üyelerinin oranının değişmesine neden olur. c. Withaferinin kök ve yaprak ekstraktının kombinasyonu, kanser hücre hatlarında sitotoksik aktivite gösterir ve RNOS oluşumunu indükler.	<i>W. somnifera</i> formülasyonu, EAC ve EAT modellerinde >%50 tümör regresyonu sağlamada oldukça etkilidir.

Çizelge 2.1 (devam): Antikanser aktivite gösteren tıbbi bitkiler ve kimyasal bileşenleri

<i>Cedrus deodara</i>	Lignanlar, Vikstromol, Matairesinol ve dibenzil bütirolaktol	b. Lignan ekstraktları insan kanser hücre hatları panelinde sitotoksiktir. a. Apoptoza yol açan nitrik oksit (NO) oluşumuna neden olur.	Fare modellerinde tümör gerilemesi gösterir.
<i>Boswellia serrata</i>	Triterpenik asitler	c. Çeşitli kanser hücre hatlarında apoptozu indükler. b. DNA sentezini ve HL-60'ın hücre büyümesini inhibe eder. c. Topoisomer I ve II'yi inhibe eder.	Beyin tümörüne karşı etkilidir.

2.3 *Inula viscosa* Bitkisi

2.3.1 *Inula viscosa* bitkisi ile ilgili genel bilgiler

Dünyanın birçok yerinde geleneksel tıpta kullanılan bitkilerden biri olan *Inula viscosa* kanser otu ya da yapışkan andız otu olarak bilinmektedir. *Inula viscosa*, Akdeniz havzasının farklı bölgelerine dağılmış halde doğal ortamda yetişen, güçlü bir kokuya sahip, aromatik, yapraklı ve 50-100 cm uzunluğunda, Asteraceae familyasına ait çok yıllık yabani bir bitkidir. Çiçeklenme Ağustos'tan Kasım'a kadar uzanan dönemde yaz ve sonbahar olmak üzere iki mevsimde görülür (Al-Eisawi, 1982, 1998).

I.viscosa dünyanın çeşitli yerlerinde geleneksel şifalı bitkiler arasında yaygın olarak anılmakta ve çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Romatizma, hemoroid, bronşit ve solunum yolu enfeksiyonları, yaraların onarılması, akciğer rahatsızlıkları, diyabet, hipertansiyon ve kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Örneğin Ürdün geleneksel tıbbında *I.viscosa* çiçekleri kronik öksürüğün ve tümörlerin tedavisi için reçete edilirken, Türk geleneksel tıbbında yaraların onarılmasında *I.viscosa* bitkisinin toprak üstünde kalan kısımları

kullanılmaktadır (Oran ve Al-Eisawi, 2015; Zeggwagh ve diğ, 2006; Benbacer ve diğ, 2012; Talib ve diğ, 2012; Seca ve diğ, 2014).

Yapılan çalışmalar *I.viscosa* bitki ekstraktlarının antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar, antipiretik ve antelmintik özellik gösterdiğini ortaya koymaktadır (Abad ve diğ, 2000; Schinella ve diğ, 2002; Abu Zarga ve diğ, 1998).

I.viscosa bitki ekstraktları biyoaktif bileşikler açısından da oldukça zengindir. Guaianolidler, seskiterpenler, seskiterpen asitler, triterpenoidler, azulenler, laktonlar, flavonoidler, kostik asit ve uçucu yağlar yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilen bazı biyoaktif bileşiklerdir (Özkan ve diğ, 2019). *I. viscosa* bitki ekstraktları içerisindeki bu bileşiklerin varlığına bağlı olarak antiproliferatif, sitotoksik ve antikanser etkileri, *I.viscosa*'nın kanser tedavisi için araştırma materyali olarak değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (Benbacer ve diğ, 2012; Talib ve diğ, 2012; Merghoub ve diğ, 2016; Bar-Shalom ve diğ, 2019). Messaoudi ve arkadaşları, *I.viscosa* bitki ekstraktlarının çeşitli kanser hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitelere sahip olduğunu bildirmiştir (Messaoudi ve diğ., 2016). Türk bilim dünyasında da kansere çare olarak *I. viscosa*'nın laboratuvarlarda araştırılması son yıllarda giderek artmaktadır (Özkan ve diğ, 2019).

I. viscosa'nın antikanser özelliğinin araştırılması dışında ekstraktlarının sitotoksik, antimikrobiyal, antioksidan, antihipertansif, hipoglisemik, hipolipidemik aktiviteleri bazı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (Çelik ve Aslantürk, 2010; Talib ve diğ, 2012; Al-Dissi ve diğ, 2001; Zeggwagh ve diğ, 2006).

2.3.2 *Inula viscosa* bitkisinin kimyasal bileşenleri

I.viscosa, birçok biyolojik etkide yer alan ve ana hücrel aktivitelerle (örneğin sitotoksik ve antiinflamatuvar etkilerle) ilişkili seskiterpen laktonların varlığı ile karakterize edilir (Seca ve diğ, 2014).

Messaoudi ve arkadaşları Fas'ın üç farklı bölgesinden elde ettikleri *I.viscosa* bitki ekstraktının kimyasal bileşimini analiz ettiklerinde, ana bileşen olarak izokostik asit, bir seskiterpen asit ve iki seskiperten laktonu: tomentosin ve inuviskoid'in varlığını ortaya çıkarmışlardır. Bu üç bitki ekstraktının hepsinin yüksek oranda tomentosin ve inuviskoid bileşenine sahip olduğu , izokostik konsantrasyonunun ise bölgeden bölgeye farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Messaoudi ve diğ, 2016).

I. viscosa bitkisinin kimyasal bileşenlerinin her birinin önemi hastalıkları tedavi etme özelliğine göre farklılık göstermektedir. Örneğin, Merghoub ve arkadaşları, SiHa ve Hela gibi rahim kanser hücreleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada; kanserli hücrelerin apoptotik ölümlerinde aktif bir bileşik olarak yaygın bir şekilde bildirilen bir seskiterpen lakton olan tomentosinin varlığının önemi üzerinde durmuşlardır (Merghoub ve diğ, 2009; Benbacer ve diğ, 2012). Tomentosinin antikanser özelliği dışında sitotoksik etkisi olduğu da yapılan çalışmalarca kanıtlanmıştır. Bu etki inuviskoid molekülü ile birlikte artış gösterirken, izokostik molekülü ile azalış göstermektedir (Messaoudi ve diğ, 2016). Muhammed ve arkadaşları, inuviskoidin tomentosin ile birlikte olan bu etkisinin çeşitli insan kanser hücreleri üzerinde büyük bir sitotoksik etkisi olduğunu bildirerek bu molekülün güçlü bir antikanser ajan olarak kullanılabileceğini vurgulamıştır (Muhammed ve diğ, 2003).

Sonuç olarak, kimyasal bileşiklerin konsantrasyonu her farklı *I. viscosa* bitkisi için değişken olup, kullanılan çözücüye ve bitkilerin yetiştirildiği çevresel koşullara göre farklılık göstermektedir. İklim, toprağın türü ve bileşimi gibi çevresel koşulların, bitkilerin kimyasal bileşimini etkileyerek dolaylı olarak onların biyolojik aktivitelerini de etkilediğine dair çalışmalar yapılmıştır (Messaoudi ve diğ, 2016).

2.3.3 *Inula viscosa* bitkisinin çeşitli kanser türleri üzerinde sitotoksik, genotoksik ve antikanser etkisini araştıran çalışmalar

Benbacer ve arkadaşları *I. viscosa* bitkisinin metanol ekstraktının, dünyada kadınlarda en sık rastlanan ikinci kanser tipi olan rahim ağzı kanseri SiHa ve HeLa hücre hatlarına karşı güçlü sitotoksik aktiviteler sergilediğini göstermişler ve IC₅₀ değerlerini sırasıyla 54 µg/ml ve 60 µg/ml olarak bildirmişlerdir. *I. viscosa* bitkisi metanol ekstraktı, hücrelerdeki apoptotik yolları aktive ederek rahim ağzı kanseri hücrelerinin proliferasyonu engellenmiştir. *I. viscosa* bitkisinin bu özelliğinden dolayı rahim ağzı kanserine karşı potansiyel antikanser ilaç özelliği taşıdığının altı çizilmiştir (Benbacer ve diğ, 2012).

Messaoudi ve arkadaşları ise, iki çeşit meme kanseri hücre hattı, MCF-7 ve MDA-MB231, üzerinde *I. viscosa* bitkisinin etanol ve etil asetat ekstraktlarının sitotoksik aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Etanol ve etil asetat ekstraktları sırasıyla 195,42 µg/ml ve 112,20 µg/ml IC₅₀ değerleri ile en iyi aktiviteleri sergilemişlerdir. Bu güçlü

sitotoksik etkinin sebebini *I.viscosa* bitkisinin kimyasal içeriğinde var olan tomentosin, inuviscolide ve izokostik asite bağlamışlardır (Messsaousi ve diğ, 2016).

Merghoub ve arkadaşları, rahim ağzı kanseri SiHa ve HeLa hücreleri üzerinde *I.viscosa* yaprak ekstrelerinin antiproliferatif aktivitelerini araştırmışlardır. Sonuç olarak, test edilen hücre hatlarına üzerinde *I.viscosa* yaprak ekstrelerinin doza bağlı olarak hücre büyümesini önemli derecede inhibe ettiği ortaya koyulmuştur. *I. viscosa* bitki ekstraktları, telomeraz aktivitesini inhibe ederek telomer kısalmasına sebep olmuştur. Özellikle, heksanik ve diklorometan fraksiyonu, sırasıyla HeLa ve SiHa hücre hatları için 6 µg/ml ve 22,04 µg/ml IC₅₀ değerleri ile güçlü bir sitotoksikite göstermişlerdir (Merghoub ve diğ, 2016). Bar-Shalom ve arkadaşları, *I.viscosa* bitkisinin sulu yaprak ekstraktlarının; hücre döngüsü ilerlemesini etkilediğini ve kolon kanseri hücrelerinde (HTC116 ve Colo320) kaspaz aktivasyonu ile apoptozu tetiklediğini göstermişlerdir. IC₅₀ değerleri her iki hücre hattı içinde yaklaşık 300 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Ayrıca in vitro testlere ilave olarak, *I.viscosa* ekstraktının, bir hayvan modelinde antitümör aktiviteler sergilediği sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, *I.viscosa*'nın sulu ekstraktının kanserin önlenmesi ve tedavi edilmesinde güçlü bir potansiyel ilaç olarak kullanılabileceği önerilmektedir (Bar-Shalom ve diğ, 2019).

Virdis ve arkadaşları ise Burkitt lenfoma hücre hatları üzerinde *I.viscosa* bitkisi etanol ekstraktının hücre çoğalmasına etkisi ve anti-tümör özelliği üzerinde çalışmışlardır. Sonuç olarak; *I.viscosa* bitkisinin etanolik ekstraktının hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, hücre canlılığında zamana bağlı bir düşüş gösterdiğini, güçlü sitotoksik aktiviteler sergilediğini ve hücre apoptozunun indüklenmesi yoluyla güçlü bir antilenfoma aktivitesine sahip olduğunu göstermişlerdir (Virdis ve diğ, 2019).

Ozkan ve arkadaşları *I.viscosa* bitkisinin su ve metanol ekstraktlarını antiproliferatif, antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri açısından incelemişlerdir. *I.viscosa*'nın iki ekstraktı, MTT yöntemi ile MCF-7 (meme kanseri hücre hattı) ve T98-G (glioblastoma hücre hattı) olmak üzere iki insan kanser hücre hattına karşı in vitro olarak test edilmiştir. Sonuç olarak, doza bağlı hücre büyümesinin önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir. *I.viscosa* bitkisinin metanol ekstresi, sırasıyla 179,5 ve 121,1 µg/ml IC₅₀ değerleri ile MCF-7 ve T98-G hücre hatlarına karşı su ekstresinden daha iyi antiproliferatif aktivite göstermiştir. Sulu özütlerin IC₅₀ değerleri 200 µg/ml'den fazladır. Bu sonuçlara göre *I.viscosa* 'nın metanol ekstraktı 121,1 µg/ml IC₅₀ değeri ile

T98-G hücrelerine karşı belirgin sitotoksik aktivite göstermiştir. Çünkü metanolik özütlerin içeriğinde daha fazla aktif bileşenler içerdiği bildirilmiştir (Ozkan ve diğ, 2019).

Bir başka çalışmada, Kamer Çolak ve arkadaşları, *I.viscosa* bitkisinin su ve metanol ekstraktlarının cilt kanseri hücreleri, A2058 ve MeWo, üzerinde alternatif bir tedavi kaynağı olarak bir antikanser ilaç olup olamayacağı potansiyelini araştırmışlardır. Sonuç olarak su ekstraktı zamana ve doza bağlı olmaksızın sitotoksik etki göstermezken, metanol ekstraktı hücre canlılığı üzerinde doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. Hücre ölümü mekanizması yine apoptoz yolları indüklenmesi ile hücrenin değişik kontrol noktalarında yakalanması ve migrasyonun engellenmesine bağlanmıştır. Bunun sonucunda, çalışmacılar *I.viscosa* bitkisinin metanol ekstraktının cilt kanseri üzerinde yeni bir antikanser ajan olarak kullanılabileceği tezini savunmuşlardır (Kamer Çolak ve diğ, 2020). Çelik ve Aslantürk yaptıkları çalışmada, *I.viscosa* bitkisi ekstraktını yüksek dozda (2.5 mg/ml, 5mg/ml, ve 10 mg/ml) kullanarak Allium testi ile soğan kök meristem hücreleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkisinin olup olmadığını incelemişlerdir. Sonuç olarak *I.viscosa* bitki ekstraktının yüksek dozda kullanılmasıyla sitotoksik ve genotoksik etkinin var olduğunu kanıtlamışlardır (Çelik ve Aslantürk, 2010). Literatür araştırmalarında *I.viscosa* bitkisinin genotoksik etkisi ile ilgili rastladığımız tek çalışma budur. Bu çalışma sağlıklı ve/veya kanser memeli hücreleri üzerinde değil bitki hücresi üzerinde yapılmıştır. Bu tez çalışmasının amacı, alternatif tıpta önemli bir yeri olan ancak etkisi halen tam olarak ortaya konulamamış olan *I.viscosa* bitkisinin memeli hücre kültüründe sitotoksik genotoksik ve antigenotoksik etkisini incelemektir. Literatürde çeşitli kanser hücre hatları üzerinde incelendiği görülen sitotoksik etki ve antikanser potansiyel ilk defa karşılaştırmalı olarak akciğer kanser hücreleri (A549) ve sağlıklı akciğer hücreleri (BEAS-2B) üzerinde incelenmiştir. Bu tez çalışmasında, *I.viscosa* bitkisinin su ve metanol ekstraktları karşılaştırmalı olarak sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik açılardan incelenmiş, akciğer kanseri üzerinde önleyici veya tedavi edici etkiye sahip olup olmadığı ve hangi bitki ekstraktının A549 hücre hattı üzerinde daha iyi antiproliferatif etki gösterdiği araştırılmıştır.

2.4 Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Bu tez çalışmasında *Inula viscosa* bitkisinin metanol ve su ekstraktları elde edildikten sonra, sağlıklı akciğer hücreleri (BEAS-2B) ve kanserli akciğer hücreleri (A549) üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla nötral kırmızısı alım (NKA) ve 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) sitotoksikite testleri, genotoksik/antigenotoksik etkinin belirlenmesi amacıyla alkali comet testi (tek hücre jel elektroforezi) uygulanmıştır.

2.4.1 Nötral kırmızı alım (NKA) yöntemi

Nötral kırmızı alım (NKA) testi hücre hasarını ve canlılığını gösteren biyomedikal alanlarda sıkça kullanılan sitotoksikite yöntemlerinden biridir (Borenfreund ve Puerner, 1985; Repetto ve diğ, 2008).

Borenfreund ve Puerner tarafından geliştirilen bu yöntem, supravital boya özelliği gösteren nötral kırmızı boyasının (3-amino-m-dimetilamino-2metil-fenazin hidroklorür), canlı hücrelere girişi ve hücrelerde lizozomal bağlanması esasına dayanan kalorimetrik bir yöntemdir. Katyonik özellik gösteren nötral kırmızı boyası kültür ortamındaki hücrelerin lizozomal matrikslerindeki anyonik bölgelere elektrostatik kuvvetler aracılığıyla bağlanır. Dolayısıyla lizozomal matrikslerde biriken nötral kırmızı miktarı ile hücre canlılığı ya da hasarı değerlendirilir (Andreoli ve diğ, 2003; Bulychev ve diğ, 1978; Weyermann, 2005).

Nötral kırmızı boyasının noniyonik yollarla hücre zarından geçişi kolaylıkla sağlanan bir işlemdir. Hücre zarındaki ya da lizozomal matriksteki herhangi bir hasar, nötral kırmızısı boyasının geçişinin azalmasına, dolayısıyla boyanın anyonik bölgelere bağlanmasının azalmasına neden olacaktır. Böylelikle canlı/sağlam ya da ölü/hasarlı hücre değerlendirilmesi bu test sayesinde analiz edilmiş olacaktır (Komissarova ve diğ, 2005). Sağlıklı memeli hücreleri kültür ortamına ekildiklerinde sürekli bölünerek sayılarını arttırmırlar. Fakat kimyasal bir madde ya da toksik maruziyete sebep olabilecek bir madde kültür ortamına eklendiğinde hücre büyüme oranını olumsuz etkiler. Hücre sitotoksikitesi, maruz kalınan toksik maddenin dozuna bağlı olarak hücre bütünlüğünün bozulmasına ve hücre büyümesinin engellenmesine sebebiyet vererek, hücre içine alınacak olan nötral kırmızı boyasının miktarında azalmaya neden olacaktır. Özetle, nötral kırmızı boyası hücre kültüründeki canlı/sağlam/hasar görmemiş hücrelerin lizozomlarında birikir, biriken nötral kırmızı boyası canlı hücre

sayısıyla doğru orantılı olarak değerlendirilir (Fotakis ve Timbrell, 2006; Yano ve Marcondes, 2005). Nörtal kırmızı alım yöntemi, diğer sitotoksite testlerine kıyasla uygulanmasının kolaylığı, güvenilirliği ve ekonomik olma gibi birtakım avantajlarıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntem olmuştur (Popiolkiewicz ve diğ, 2005; Weyermann ve diğ, 2005).

2.4.2 3-[4,5-dimetilltiyazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromid (MTT) yöntemi

MTT (3-[4,5-dimetilltiyazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromid) testi kolay, hızlı ve ekonomik bir sitotoksisite testidir ve canlı hücrelerdeki mitokondrial dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla sarı renkli tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının, mor formazana dönüşmesiyle canlı hücreleri ölü/hasarlı hücrelerden ayırmak için kullanılır.

MTT ölçümü, kolorimetrik bir yöntem olup mitokondrilerin matriksinde bulunan süksinat dehidrogenaz'ı hedef alır. MTT, süksinat dehidrogenaz enzimine bağlanır ve canlı hücrelerdeki dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla suda çözünmeyen mor formazan kristalleri oluşur. Suda çözünmeyip, organik çözücüler aracılığıyla çözünen formazan kristalleri, spektrofotometrik yöntemle mikro plaka okuyucuları ile konsantrasyona bağlı olarak belli dalga boylarında absorbans verir. Böylelikle, dolaylı yünden hücre canlılığı ile absorbans değeri arasında doğrusal ilişki kurularak, hücre canlılığı tayin edilmiş olur (Fotakis ve Timbrell, 2006; Barile, 1994; Mosmann, 1983; Smith, 1951).

2.4.3 Tek hücre jel elektroforezi (Comet) yöntemi

Tek hücre jel elektroforezi yöntemi ya da diğer bir adıyla comet yöntemi, tek hücre DNA hasarlarının ve bu hasarların onarımının saptanması ve değerlendirilmesinde kullanılan, in vitro, in vivo, ex vivo gibi tüm ortamlara uygulanabilen bir tekniktir. Comet yöntemi, son yıllarda yapılan genotoksisite çalışmalarından moleküler epidemiyoloji, ekogenotoksikoloji çalışmalarında, DNA hasarının ve onarımının araştırılmasında sıklıkla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Comet yöntemi çalışma prensibi gereği hızlı, hassas, kolay ve kullanışlı olma özelliklerinden dolayı standart bir test olarak kullanılmaya başlanmış ve yapılan çalışmalara oldukça katkı sağlamıştır (Cemeli ve diğ, 2009; Collins, 2004).

Comet yöntemi ilk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından tek bir hücredeki DNA hasarını görüntülemek üzere geliştirilmiştir. Bu yöntemin üzerine, Singh ve

diğerlerinin yapmış olduğu revizyonla tek hücre jel elektroforezi tekniği alkali ortamda DNA'nın çift zincirinin açılmasına neden olacak şekilde değiştirilmiştir. (Ostling ve Johanson, 1984; Singh ve diğ, 1988).

Tek hücre jel elektroforezi tekniği ile kolaylıkla memeli hücrelerinde DNA kırıklarını incelenebilir ve ölçümünü yapılabilir. Yöntemin içeriğinde, kimyasal ya da fiziksel bir ajana maruz kalan az sayıda memeli hücresi agaroz kaplanmış mikroskop lamalarının üzerine yayılır ve lize edilirler. Ardından elektrik akımına maruz bırakılırlar. Kimyasal ya da fiziksel ajanın sebep olduğu tahribiyete maruz kalan DNA'lar kırıklar oluştururlar ve elektrik akımının etkisiyle oluşan DNA kırıkları çekirdekten uzaklaşarak göç ederler (Cemeli ve diğ., 2009; Collins ve diğ, 1997; Tice ve diğ, 2000).

Tek hücre jel elektroforezi yöntemi, tek hücredeki DNA hasarının direkt değerlendirmesini araştırabildiği gibi bir popülasyona uygulanan fiziksel ya da kimyasal ajanın tüm hücrelerde aynı derecede tahribata sebebiyet verip vermediğinin tayininde de kullanılmaktadır. Örneğin, radyoterapi ve ya kemoterapik yöntemlerle tedavi edilmeye çalışılan tümör hücrelerinin toplu heterojen cevabının araştırılmasında comet yöntemi kullanılabilir (Singh ve diğ, 1988).

Tek hücre jel elektroforezi yöntemi, tek ve çift DNA kırıklarının tayininde kullanılan ve yöntemi kullanan çeşitli kullanıcılar tarafından modifiye edilen bir yöntemdir. Tek ve çift zincir kırıklarında nötral liziz, tek zincir kırıklarında ise alkali liziz uygulanmaktadır. Ancak, genotoksik bir ajan DNA'da daha çok tek zincir kırıklarına sebebiyet verdiği için alkali liziz daha çok kullanılan bir yöntemdir. Çünkü, tek zincir kırıkları daha çok alkali oynak bölgelerinin oluşumuyla var olur (Fairbairn ve diğ, 1995; Tice ve diğ, 2000).

Tek hücre jel elektroforez yönteminde, tekniğın çalışması için çok az sayıda hücre gerektiğinden biyopsi sonucunda alınan hücrelerdeki ve deney hayvanlarından alınan doku hücrelerindeki DNA kırılmalarının boyutlarını tayin etmek mümkündür. Yöntemin elektroforez bölümde görülen çeşitli uygulama farklılıkları; uygulanan elektroforez zamanı, tampon çözeltideki tuz konsantrasyonu, elektroforez için uygulanan voltaj ve DNA hasar düzeyi değerlendirmesi ile alakalıdır. Comet (kuyruklu yıldız) oluşum şekillerinin tayinini yapmak için çeşitli yaklaşımlar vardır. Bu yaklaşımların en basiti hasar boyutuna bağlı olarak hücreleri amprik şekilde gözle kaydetmektir. Bunun için 515-600 nm'lik epi-floresan mikroskoplar kullanılır.

Hücredeki DNA hasarı; DNA göçü, comet kuyruk uzunluğu, comet baş çap, comet alanı, kuyruk momenti görünüşlerine göre değerlendirilir. (Collins ve diğ, 1997; Singh ve diğ, 1988; Tice ve diğ, 1990, 2000).

Kromozom aberasyonu, mikroçekirdek testi ve kardeş kromatid değişimi testi gibi DNA hasarının tayin etmekte kullanılan diğer yöntemlere nazaran comet testi pek çok avantaja sahiptir. Bunlar, ekonomik ve hızlı oluşu, az sayıda örneğe ihtiyaç duyulması, az miktarlarda test malzemesinin kullanılması, testin duyarlılığının yüksek oluşu ve de DNA hasarını tek bir hücre düzeyinde inceleme fırsatını sunmasıdır. Bu avantajlarının yanısıra, yüksek DNA hasarlarını belirleyememesi veya 50 kb'dan küçük DNA hasarlarını belirleyememesi açısından comet yönteminin sınırlılıkları mevcuttur (Nossoni, 2008).



3. MATERYAL VE METOD

3.1 Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasının deneyleri yapılırken kullanılan kimyasal maddeler ve kimyasal maddelerin tedarikçi firmaları aşağıdaki gibidir:

Nötral Kırmızı (Sigma), 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)(Sigma), RPMI-1640 (Sigma), Fetal Sığır Serum (FBS) (Sigma), Tripan Mavisi (Sigma), Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (Gibco), Penisilin/Streptomisin (Sigma), Dimetil sulfoksit (DMSO) (Merck), Etil Alkol (Etanol) (Sigma), Metil alkol (Metanol) (%99) (Sigma), Asetik Asit (Glasiyel, %99) (Sigma), Nitrik asit (HNO₃) (VWR), Hidroklorik asit (%37) (Sigma), Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA) (Sigma), Etidiyum Bromür (EtBr) (Sigma), Hidrojen peroksit (%35) (Merck), Normal Erime Noktalı Agar (NMPA) (Sigma), Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA) (Sigma), Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck), Sodyum Klorür (NaCl) (Merck), Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat (Na₂HPO₄.2H₂O) (Merck), Potasyum klorür (KCl) (Isolab), Tripsin-EDTA (Gibco), Triton X-100 (Across), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma), Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH₂PO₄) (Tekkim), N-Lauril Sarkosinat Sodyum Tuzu (Sigma), Tris (Across).

3.2 Araç ve Gereçler

Bu tez çalışmasının deneyleri yapılırken kullanılan araç gereçler ve bu araç gereçlerin tedarik edildiği firmalar aşağıdaki gibidir:

Thoma lamı (Sayım lamı) (Isolab), Lam (26x76 mm) (Marienfield), Steril Tüpler (50 ml) (Isolab), Steril 12 Kuyucuklu Plaklar (SPL), Steril 96 Kuyucuklu Plaklar (SPL), Steril membran filtre (0,22µ) (Isolab), Steril Santrifüj Tüpleri (15 ml) (Isolab), Steril pipetler (10 ve 25ml), Steril enjektör (2 ve 10 ml'lik) (Set Inject), Yatay Hücre Kültürü Şişesi (75cm²) (Isolab), Pipet tabancası (Thermo), Su Banyosu (Nuve, VWR), Manyetik Karıştırıcı (BioCote), Distile Su Cihazı (Merck), Hassas Terazi (UniBloc),

pH metre (Mettler Toledo), Santrifüj (Onilab), Vorteks (BioCote), Mikrodalga fırın (Vestel), Mikrosantrifüj (Beckman Coulter), Yatay Çalkalayıcı (Daihan), Mikroplaka okuyucu (Epoch, BioTek Instruments, Inc.), Derin Dondurucu (-80°C) (Arctico), Derin Dondurucu (-20°C) (Arçelik), Buzdolabı (Arçelik), Karbondioksit (CO₂) İnkübatörü (Panasonic), Steril Kabin (Telstar), Floresan Mikroskop (Zeiss), Inverted Mikroskop (Olympus), Spektrofotometre (BioTek), Mikropipet (100-1000µl) (Eppendorf), Mikropipet (30-300 µl 8 kanallı) (Eppendorf), Comet Bilgisayar Yazılımı (Perceptive Software).

3.3 *Inula viscosa* Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması ve Kullanılan Çözeltiler

3.3.1 *Inula viscosa* Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Manisa'nın Akhisar ilçesinden sonbahar (kasım ayı) çiçeklenme döneminde toplanmış olan *I. viscosa* bitkisi kurutulmuş halde temin edildi. *I. viscosa* çiçek ve yaprakları su ile yıkanarak kuruması için 24 saat süre ile hava dolaşımli etüve bırakıldı. Daha sonra, kurutulan bitki parçaları elektrikli öğütücü kullanılarak olabildiğince ince toz (yaklaşık 63 µm çap) haline getirildi (Kraouche, 2018).

I. viscosa bitkisi distile su ve metanol ekstraktı olmak üzere iki farklı şekilde ekstrakte edildi. Distile su ekstraktı için, 20 gram toz haline getirilmiş bitkiden alınarak 200 ml distile su içerisine karıştırıldı (1:10, w/v). 40 °C'ye hazırlanmış su banyosu içerisinde 24 saat süreyle inkübe edildi. Akabinde, elde edilen supernatant 0.2 mikrometre Whatmann filtreden geçirilerek santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından elde edilen süpernant liyofilizatör işlemi için -80 °C'ye kaldırıldı. -80°C'de donan distile su ekstraktı liyofilizatörde 24 saat süreyle bekletildi. Liyofilizatörden alınan toz halindeki su ekstraktı kapaklı şişeye alınarak -20 °C'de her bir deney için taze hazırlanmak üzere saklandı (Özkan ve diğ, 2019; Lounis ve diğ, 2018).

Yüzde verim hesabı için; kurutulmuş ekstraktın gram cinsinden kütlesi, ekstrakte edilmiş toz bitki örneğinin gram cinsinden kütlesine bölünüp yüz ile çarpılmasıyla elde edildi. Bu formülden hareketle, *I. viscosa* bitkisi su ekstraktı verimi %51,9 olarak hesaplandı.

I. viscosa bitkisi metanol ekstraktı için, 20 gram toz haline getirilmiş bitkiden alınarak 200 ml metanol içerisine karıştırıldı (1:10, w/v). 40 °C'ye hazırlanmış su banyosu içerisinde 24 saat süreyle inkübe edildi. Akabinde, 0.2 mikrometre Whatmann

filtreden geçirilen metanol ekstraktı rotary evaporator (döner buharlaştırıcı)'e konularak metanolun uçurulması sağlandı. Ardından, elde edilen metanol ekstraktı liyofilizasyon işlemi için -80°C'ye kaldırıldı. -80°C'de donan metanol ekstraktı liyofilizatörde 24 saat süreyle bekletildi. Liyofilizatörden alınan toz halindeki metanol ekstraktı kapaklı şişeye alınarak -20°C'de her bir deney için taze hazırlanmak üzere saklandı (Velayudhan ve diğ, 2017).

Verim formülünden hareketle, *I.viscosa* bitkisi methanol ekstraktının verimi %11,5 olarak hesaplandı.

3.3.2 NKA yönteminde kullanılan çözeltiler

Hücre kültürü için, 50 ml RPMI 1640 üzerine 5 ml (%10) FBS ve 0,5 ml (%1) penisilin/streptomisin eklenerek besiyeri ortamı hazırlandı. Hazırlanan besiyeri kullanıldıkça yerine taze besiyeri hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

Fiksasyon aşaması için, 200 ml (%50) etil alkol, 4 ml asetik asit (%1) ve 196 (%49) ml distile su ile karıştırılarak fiksasyon çözeltisi hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

Nötral kırmızı stok çözeltisi hazırlamak için, 40 mg nötral kırmızısı boyası 10 ml distile su içerisinde çözüldü. Su banyosunda 1 saat çalkalanarak ışık görmeyecek şekilde çözünmesi sağlandı. Hazırlanan çözelti alüminyum folyoya sarılarak +4°C'de muhafaza edildi.

Nötral kırmızı standart çözeltisi hazırlamak için, uygulamanın yapılacağı günün bir gün öncesi 1250 µl NK stok çözeltisi 100 ml FBS içermeyen besiyeri ile karıştırılarak hazırlandı. 37°C'de 24 saat süreyle inkübatörde bekletildi.

3.3.3 MTT yönteminde kullanılan çözeltiler

Hücre kültürü besiyeri ortamı hazırlamak için nötral kırmızısı alım yönteminde hazırlanan besiyeri kullanıldı. Fiksasyon aşamasında ise DMSO çözeltisi kullanıldı.

MTT stok çözeltisi hazırlamak için, +4°C'de toz halinde muhafaza edilen MTT, 5 mg/ml oranında olacak şekilde PBS ile sulandırıldı.

MTT standart çözeltisi hazırlamak için ise, 1 ml MTT stok çözeltisi 9 ml RPMI ile sulandırılarak hazırlandı. Hazırlanan çözelti membran filtreden geçilerek ışık görmeyecek şekilde alüminyum folyoya sarılıp +4°C'de muhafaza edildi.

3.3.4 Comet yönteminde kullanılan çözeltiler

Stok lizis çözeltisi hazırlamak için; 146,1 NaCl, 37,2 g Na₂EDTA, 1,2 g Tris 500 ml distile suda çözüldükten sonra 10 g NaOH eklenip çözelti pH'sı 10'a ayarlandı. 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklenerek son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Lizis çözeltisi hazırlamak için; 489,5 ml stok lizis çözeltisi, 5,5 ml Triton X-100 ve 55 ml DMSO karıştırıldı. Çözelti uygulama günü hazırlandı ve 4°C'de bekletilerek soğuk çözelti kullanıldı.

200 mM EDTA çözeltisi hazırlamak için; 14,89 g EDTA 200 ml distile suda karıştırılarak çözüldü. pH metre kullanılarak çözeltini pH'ı 10'a ayarlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Elektroforez tampon çözeltisi hazırlamak için; 530,7 ml soğuk distile su içerisine 16,5 ml 10 N NaOH ve 2,75 ml 200 mM EDTA çözeltisi karıştırıldı ve uygulama günü taze hazırlanarak kullanıldı.

Nötralizasyon tampon çözeltisi hazırlamak için; 48,5 mg Tris 750 ml distile suda çözülerek çözelti pH'sı HCl kullanılarak 7,5'a ayarlandı. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Etanol çözeltisi hazırlamak için; %50, %75 ve %95'lik etanol çözeltileri istenilen oranlarda distile su kullanılarak hazırlandı.

1 mM Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi hazırlamak için; %35'lik H₂O₂ çözeltisinden 9,7 µl alınarak 990 µl PBS ile karıştırıldı ve 100 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlandı. Uygulama günü hazırlanan çözeltiden 10 µl alınıp 990 µl PBS ile karıştırılarak 1 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlandı.

Etidiyum bromür (EtBr) çözeltisi hazırlamak için; 10 mg EtBr 50 ml distile su içerisinde çözülerek 200 µg/ml'lik stok EtBr çözeltisi hazırlandı. Boyama gününde, stok EtBr çözeltisinden 1 ml alınıp distile suyla 10 ml'ye tamamlanarak 20 µg/ml'lik EtBr çözeltisi hazırlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.4 Sitotoksosite ve Genotoksisitenin Belirlenmesi

3.4.1 NKA yöntemi ile sitotoksisitenin belirlenmesi

Sitotoksosite çalışmalarında BEAS-2B (sağlıklı akciğer epitel hücresi) ve A549 (kanserli akciğer epitel hücresi) hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümünden Bursa Teknik Üniversitesi Biyomühendislik bölümünde yürütülen çalışmalarda kullanılmak üzere verilmiştir. Transfer edilen bu hücreler bir süre steril şartlarda pasajlanarak kryotüplerde dondurularak -80°C’de saklanmıştır. Çalışmalar sırasında, hücrelerin ileri alt kültürler arasından seçilmemesine dikkat edilmiştir.

- -80°C’de saklanan hücreler su banyosu içerisinde 1-2 dakika bekletilerek çözülmesi sağlanmıştır.
- Kabin içerisinde, steril bir falkona %5 oranında FBS içeren PBS çözme solüsyonu hazırlanmıştır. 37°C’den alınan hücreler bu çözme solüsyonuna pipet ile vialden aktarılmıştır. Daha sonra 400 g’de 10 dakika santrifüj yapılarak süpernatant kısmı atılmıştır.
- Kalan hücre pelleti hacimce % 90 RPMI, % 10 fetal sığır serumu (FBS), % 1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren besiyeri ile karıştırılarak yatay kültür kapları içerisine aktarılmıştır.
- 37°C’de % 5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatör içerisinde kültür edilerek steril ortamda çoğaltılmıştır.
- Büyümeye bırakılan hücreler, %70-80 doygunluğa ulaştıklarında hücre pasajı yapılmıştır.
- Pasaj aşamasında, besiyeri uzaklaştırılıp, hücreler 7 ml ılık PBS ile yıkanarak, üzerine 3 ml Tripsin çözeltisi eklenerek 3-4 dakika bekletilmiştir. Hücreler yapıştıkları yerden kalkana kadar kültür kabının tabanına hafif hafif vurulmuştur.
- Steril bir tüpe 10 ml besiyeri konularak, tripsin sayesinde zeminden ayrılarak süspansiyon haline getirilen hücreler eklenmiştir.
- Hücre süspansiyonu 400 g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

- Süpernatant kısmı çalışma kabini içerisinde uzaklaştırılmış ve dipte toplanan hücre pelleti hücrenin yoğunluğuna göre 1-2 ml besiyeri ile dikkatlice karıştırılmıştır.
- Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak bir ependorf tüpe aktararak üzerine 10 µL tripan mavisi çözeltisi eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- Thoma lamı üzerine lamel yerleştirilerek, yaklaşık 20 µL hücre süspansiyonu ile doldurulmuştur.
- Thoma lamında hücre sayımı yapıldıktan sonra hazırlanan hücreler çoklu pipet yardımıyla 96 kuyucuklu plakalara 200 µl 10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- Plaka inkübatöre kaldırılarak 24 saat inkübasyona bırakılmış, hücrelerin kuyucuklar içinde tutunarak çoğalmaları beklenmiştir.
- Bu esnada steril tüplerde besiyeri içerisinde çalışılması planlanan *Inula viscosa* metanol ve su ekstraktları ana stoktan seyreltmeler yapılarak her biri 10 ml olan 7 farklı konsantrasyon (1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 µl/ml) olacak şekilde hazırlanıp ve 200 µl/ kuyucuk olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiştir.
- Negatif kontrol grubu olarak normal besiyeri ortamı ve pozitif kontrol olarak %1 Triton X-100 içeren besiyeri ile hücreler muamele edilerek 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.
- Bir sonraki gün çalışma sırasında kullanılmak üzere nötral kırmızı çözeltisi (100 ml besiyeri+ 1250 µl Nötral kırmızı stok çözeltisi) hazırlanarak inkübasyona bırakılmıştır.
- 24 saat sonunda plak içindeki test maddesini içeren besiyeri boşaltılmıştır. Bir gün önceden hazırlanan nötral kırmızı çözeltisinden her bir kuyucuğa 200 µl eklenerek 3 saat daha inkübasyon yapılmıştır.
- Süre sonunda boya ortamdan uzaklaştırılmış ve kuyucuklar 3-4 kez ılık PBS ile yıkanmıştır.
- Tüm hücrelere 200 µl %50 metil alkol, %1 asetik asit ve %49 distile su karışımından oluşan fiksasyon çözeltisi eklenmiştir.
- Plakalar, plaka çalkalayıcı üzerine yerleştirilerek 20 dakika süre ile çalkalanmıştır.

- Plakalardaki hücrelerin optik yoğunlukları plak okuyucuda 540 nm dalga boyunda okutulmuştur.
- Deneylerin her aşaması mümkün olduğunca karanlıkta yapılmıştır.
- Deneyler, farklı zamanlarda olmak üzere 3 kez tekrarlanıp sonuçlar bu 3 çalışmanın ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

3.4.2 MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Sitotoksite çalışmalarında BEAS-2B ve A549 hücre hatları kullanılmıştır.

- NKA testinde anlatıldığı şekilde hücreler çoğaltılmıştır.
- Hücreler MTT analizi için 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmiştir.
- 24 saat inkübasyonun sonunda hücrelerin kuyucuklar içerisine tutunması sağlanmıştır.
- 24 saat sonunda steril şartlarda besiyeri uzaklaştırılmıştır.
- Bu esnada steril tüplerde besiyeri içerisinde çalışılması planlanan *Inula viscosa* metanol ve su ekstraktı ana stoktan seyreltmeler yapılarak her biri 10 ml olan 7 farklı konsantrasyon (1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 µl/ml) olacak şekilde hazırlanıp ve 200 µl/ kuyucuk olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiştir.
- Negatif kontrol grubu olarak normal besiyeri ortamı ve pozitif kontrol olarak %1 Triton X-100 içeren besiyeri ile hücreler muamele edilerek 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.
- 24 saat inkübasyonun sonunda test maddesini içeren besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µl MTT çözeltisinden eklenmiştir.
- Hücreler, 37°C'de % 5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatör içerisinde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Sürenin sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırılmıştır.
- Oluşması beklenen formazan kristalleri 100 µl/kuyucuk olacak şekilde DMSO ile çözülmüştür.
- Kültür plakaları 10 dakika yatay çalkalayıcıya konduktan sonra oluşan renk değişim miktarı plak okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür

- Deneyler farklı zamanlarda olmak üzere 3 kez tekrarlanıp; sonuçlar bu 3 çalışmanın ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

3.4.3 Comet yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkinin belirlenmesi

Ekstrelerin comet yöntemi ile genotoksik ve H₂O₂ tarafından oluşturulan genetik hasara karşı olası antigenotoksik etkilerini incelemek amacıyla BEAS-2B ve A549 hücre hatları kullanılmıştır.

- 12 kuyulu kültür plakalarına; 1 ml besiyeri içerisinde 10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekilerek 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.
- 24 saatin sonunda genotoksik etkisi araştırılan ekstraktın belirlenen konsantrasyonları besiyeri içerisinde hazırlanarak her kuyucuğa 1 ml olacak şekilde madde uygulaması yapılmıştır.
- Ekstraktlarla inkübasyon sonrasında hücreler 1 ml PBS ile 2 defa yıkanmıştır.
- 400 µl tripsin çözeltisi her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. 3-5 dk inkübasyon süresi sonunda 600 µl besiyeri eklenerek tripsin inaktive edilmiştir.
- Toplamı 1000 µl olan hücre süspansiyonu eppendorf tüplere alınmıştır.
- Mikrosantrifüjde 2000 rpm'de 5 dk süreyle hücre süspansiyonu santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılarak 1 ml PBS ile hücreler resuspende edilmiştir. Bu aşamada thoma lamı kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.
- Resuspende edilen hücre süspansiyonundan normal grup uygulamaları için 50 µl hücre alınarak 50 µl %0,75'lik LMA ile eppendorf tüp içerisinde karıştırılmıştır.
- H₂O₂ li gruplar için ise; ayrı bir eppendorf tüpüne 900 µl PBS üzerine 50 µl hücre ve en son 50 µl H₂O₂ (son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde) ilave edilerek 5 dk süre ile +4 buzdolabında bekletilmiştir.
- Daha sonra tüpler 3000 rpm'de 5 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj takiben, 950 µl süpernatant atılarak dipte kalan 50 µl hücre 50 µl %0,75'lik LMA ile karıştırılmıştır.

- Tüm uygulama grupları için LMA ile karıştırılan hücreler, 10.000-20.000 hücre/lam olacak şekilde NMA ile kaplanmış olan lamlara yayılmıştır. Lamlar buz üzerinde yaklaşık 10-15 dk süre ile bekletilerek agarın katılaşması sağlanmıştır.
- 15 dk sonunda lam üzerinde bulunan lameller alınarak lamlar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen liziz çözeltisi içerisinde 1-1,5 saat süreyle bekletilmiştir.
- Liziz işleminden sonra lamlar elektroforez tankının içerisine yerleştirilmiştir (rodajlı kısım siyah elektrot tarafına bakmalıdır). Yerleştirilen lamlar elektroforez çözeltisi içerisinde akım uygulanmadan 20 dk bekletilmiştir.
- 20 dk sonunda 21 V 600 mA akım ile 20 dk boyunca elektroforez uygulanmıştır.
- Ardından lamlar 5 dk distile suda, takiben 15 dk nötralizasyon çözeltisinde bekletilmiştir.
- Daha sonra, lamlar sırayla 5'er dakikalık periyotlarla %50 lik, %75'lik ve %95 lik etanol çözeltileri içerisinde bekletilmiştir.
- Tüm işlemler karanlıkta yapılmıştır.
- Comet analizleri aşamasında lamlar üzerine etidium bromür çözeltisi ilave edilip floresan mikroskop altında incelenmiştir.
- Her deneyde tüm konsantrasyonlar için lamlar ikişer tekrarlı hazırlanmış ve tüm deneyler birbirinden bağımsız olarak ayrı zamanlarda 3 kez tekrarlanmıştır.
- Her uygulama grubundan 100 hücre ve ayrı zamanlardaki 3 ayrı tekrarlı çalışma için toplamda 300 hücre comet analiz programı ile kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametrelerine göre DNA hasar derecesi değerlendirilmiştir.

3.5 İstatistiksel Yöntemler

Sitotoksikite testlerinde (NKA ve MTT) her bir örnek kontrol grubu ile kıyaslanarak % hücre canlılık olarak belirlenmiştir.

Tek hücre jel elektroforez (Comet) yönteminde, tüm veriler IBM SPSS 22.0 yazılım programında ANOVA, LSD testi kullanılarak değerlendirilmiş, uygulama grupları genotoksite için negatif kontrolle; antigenotoksite için pozitif kontrolle karşılaştırılarak istatistiksel anlamlılıkları değerlendirilmiştir.



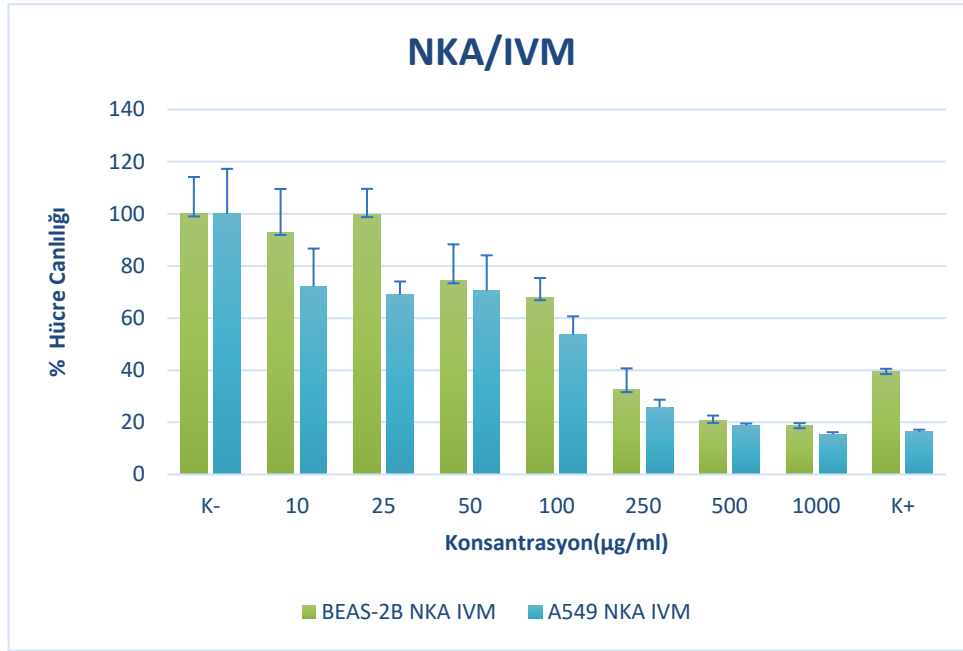
4. BULGULAR

4.1 Sitotoksitenin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

4.1.1 *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının NKA yöntemi ile sitotoksitelerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

4.1.1.1 *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ekstraktının NKA yöntemi ile sitotoksitenin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Inula viscosa bitkisinin metanol ekstraktının 7 farklı konsantrasyonun (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml) sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücrelerindeki sitotoksik etkisi NKA yöntemi ile değerlendirilmiştir. NKA deneyi sonuçlarına göre; 10-100 µg/ml uygulama konsantrasyonları hücre canlılığı üzerine sitotoksik etki göstermemiştir. 250 µg/ml konsantrasyonunda ise hücre canlılığı %50'nin altına düşmüştür (Şekil 4.1). Ayrıca, 7 farklı konsantrasyonun hepsinde BEAS-2B hücre canlılığı A549 hücre canlılığından fazladır (Şekil 4.1). *Inula viscosa*'nın metanol ekstraktının NKA yöntemine göre IC₅₀ değeri BEAS-2B hücreleri için 178,65 µg/ml olarak, A549 hücreleri için ise 119,37 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

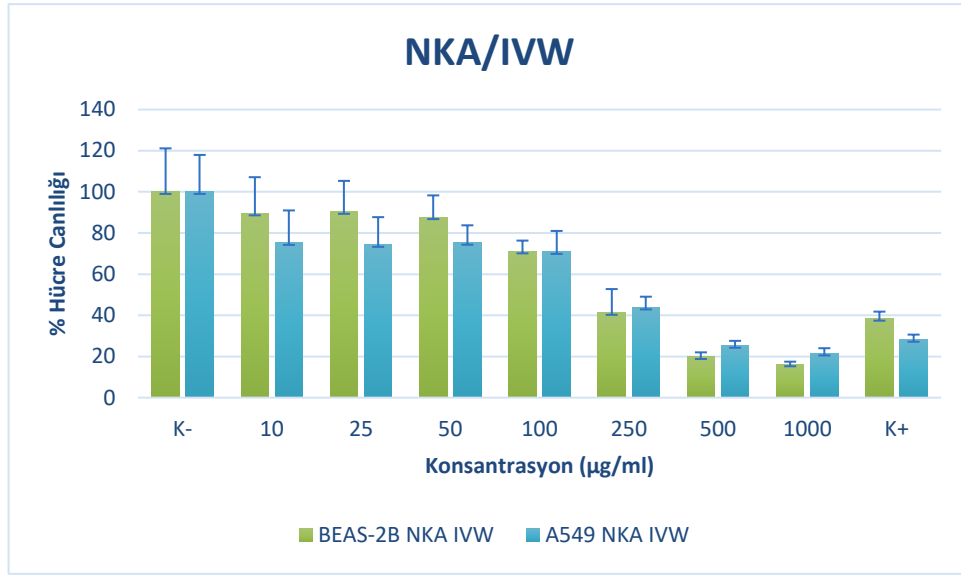


Şekil 4.1: NKA yöntemine göre *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ekstraktının sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücrelerinde sitotoksik etkisinin karşılaştırılması. *

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.1.2 *Inula viscosa* bitkisinin su (IVW) ekstraktının NKA yöntemi ile sitotoksitenin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Inula viscosa bitkisinin su ekstraktının 7 farklı konsantrasyonun (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml) sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücrelerindeki sitotoksik etkisi NKA yöntemi ile değerlendirilmiştir. NKA deneyi sonuçlarına göre; 10-100 µg/ml uygulama konsantrasyonları hücre canlılığı üzerine herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. 250 µg/ml konsantrasyonunda ise hücre canlılığı %50'nin altına düşmüştür (Şekil 4.2). Ayrıca, 7 farklı konsantrasyonun 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonları hariç hepsinde yüzde BEAS-2B hücre canlılığı yüzde A549 hücre canlılığından fazladır (Şekil 4.2). *Inula viscosa*'nın su ekstraktının NKA yöntemine göre IC₅₀ değeri BEAS-2B hücreleri için 206,07 µg/ml olarak, A549 hücreleri için ise 215,86 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).



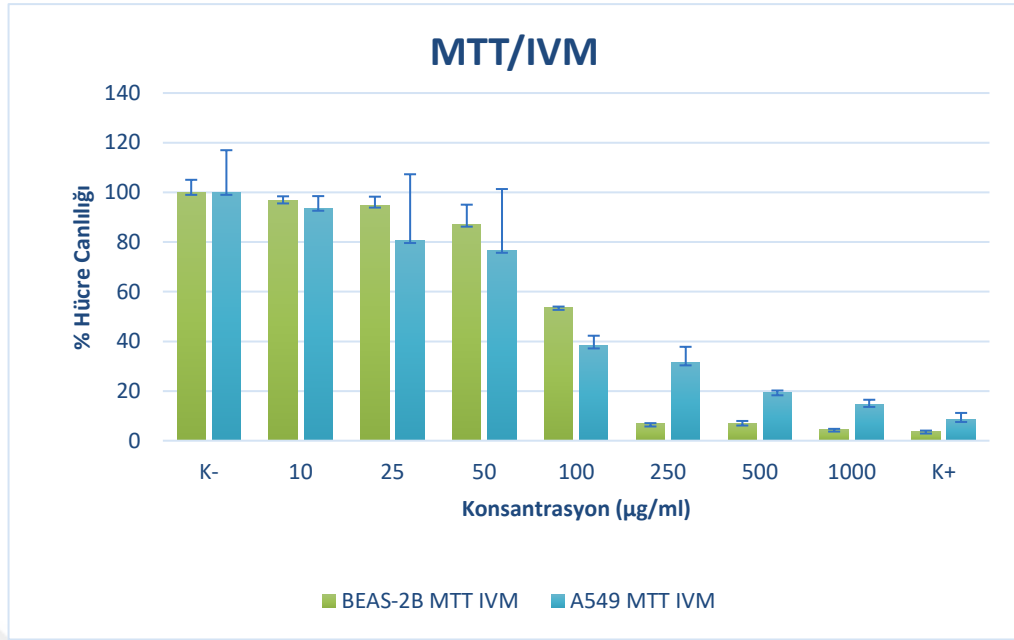
Şekil 4.2: NKA yöntemine göre *Inula viscosa* bitkisinin su (IVW) ekstraktının sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücrelerinde sitotoksik etkisinin karşılaştırılması. *

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.2 *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının MTT yöntemi ile sitotoksitelerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

4.1.2.1 *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ekstraktının MTT yöntemi ile sitotoksitenin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Inula viscosa bitkisinin metanol ekstraktının 7 farklı konsantrasyonun (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml) sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücrelerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. MTT deneyi sonuçlarına göre; 10-100 µg/ml uygulama konsantrasyonları hücre canlılığı üzerine herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. 250 µg/ml konsantrasyonunda BEAS-2B hücrelerinin hücre canlılığı %50'nin altına düşerken, A549 hücreleri için hücre canlılığı 100 µg/ml konsantrasyonundan sonra %50'nin altına düşmüştür (Şekil 4.3). Ayrıca, 7 farklı konsantrasyonun 250, 500 ve 1000 µg/ml gibi sitotoksik etki gösteren konsantrasyonları haricinde geriye kalan konsantrasyonlarda yüzde BEAS-2B hücre canlılığı yüzde A549 hücre canlılığından fazladır (Şekil 4.3). *Inula viscosa*'nın metanol ekstraktının MTT yöntemine göre IC₅₀ değeri BEAS-2B hücreleri için 111,78µg/ml olarak, A549 hücreleri için ise 84,62 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

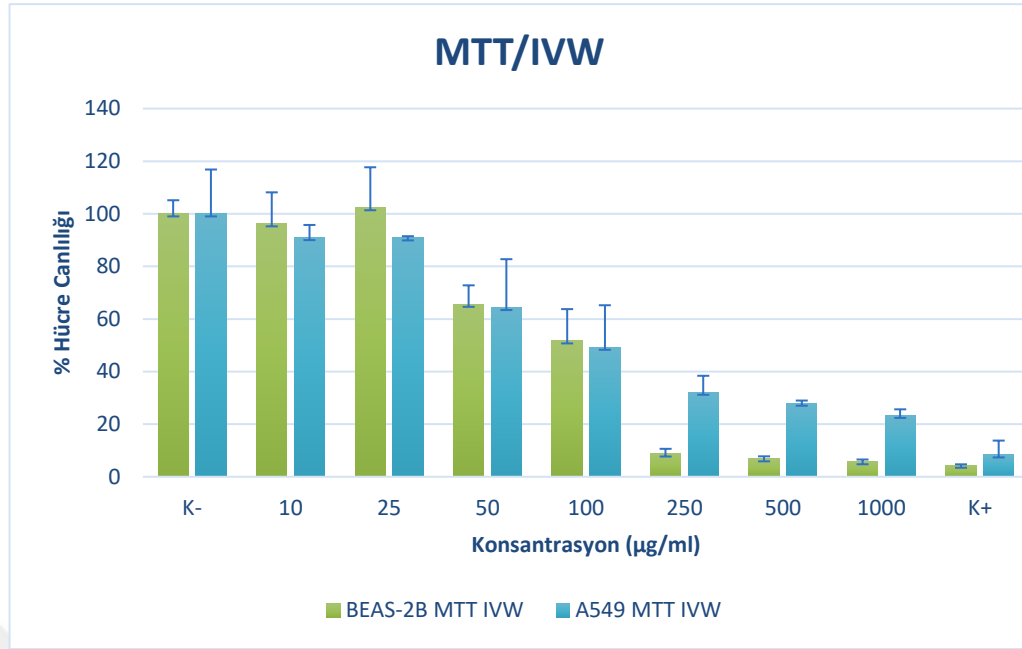


Şekil 4.3: MTT yöntmine göre *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ekstraktının sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücrelerinde sitotoksik etkisinin karşılaştırılması. *

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.2.2 *Inula viscosa* bitkisinin su (IVW) ekstraktının MTT yöntemi ile sitotoksitenin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Inula viscosa bitkisinin su ekstraktının 7 farklı konsantrasyonun (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml) sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücrelerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. MTT deneyi sonuçlarına göre; 10-100 µg/ml uygulama konsantrasyonları hücre canlılığı üzerine herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. 100 µg/ml konsantrasyonu itibariyle hem BEAS-2B hücrelerinin hem de A549 hücrelerinin canlılığı %50'nin altına düşmüştür (Şekil 4.4). Ayrıca, 7 farklı konsantrasyonun 250, 500 ve 1000 µg/ml gibi sitotoksik etki gösteren konsantrasyonları haricinde geriye kalan konsantrasyonlarda yüzde BEAS-2B hücre canlılığı yüzde A549 hücre canlılığından fazladır (Şekil 4.4). *Inula viscosa*'nın metanol ekstraktının MTT yöntemine göre IC₅₀ değeri BEAS-2B hücreleri için 105,91µg/ml olarak, A549 hücreleri için ise 93,6µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

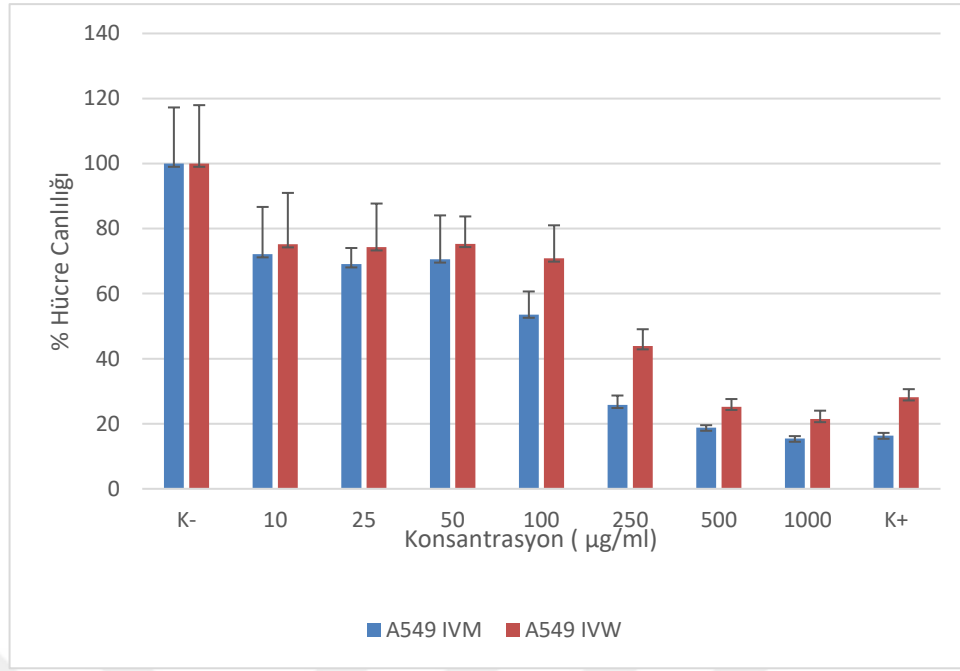


Şekil 4.4: MTT yöntemine göre *Inula viscosa* bitkisinin su (IVW) ekstraktının sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücrelerinde sitotoksik etkisinin karşılaştırılması. *

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.3 *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının kanserli akciğer (A549) hücreleri üzerinde antiproliferasyon etkisinin kıyaslanmasına ilişkin bulgular

Inula viscosa bitkisinin metanol ve su ekstraktlarının 7 farklı konsantrasyonun (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml) kanserli akciğer hücreleri (A549) üzerindeki antiproliferatif etkisi NKA yöntemi ile değerlendirilmiştir. NKA deneyi sonuçlarına göre; 7 farklı konsantrasyonun hepsinde su ekstraktının yüzde A549 hücre canlılığı metanol ekstraktının yüzde A549 hücre canlılığından fazladır (Şekil 4.5). Diğer bir deyişle, *Inula viscosa* bitkisinin metanol ekstraktı su ekstraktına göre daha iyi antiproliferatif etki göstermiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının NKA yöntemine göre kanserli akciğer (A549) hücreleri üzerinde antiproliferasyon etkisinin karşılaştırılması. *

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Çizelge 4.1’de BEAS-2B ve A549 hücre hatlarının metanol, su ekstraktları ve NKA, MTT yöntemlerine göre IC₅₀ değerleri çizelge halinde toplu şekilde verilmiştir.

Çizelge 4.1: NKA ve MTT testi ile belirlenen IC₅₀ değerleri.

Uygulamalar	NKA Yöntemi (µg/mL)	MTT Yöntemi (µg/mL)
BEAS-2B/IVM	178,65	111,78
BEAS-2B/IVW	206,07	105,91
A549/IVM	119,37	84,62
A549/IVW	215,86	93,6

4.2 Genotoksisitenin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

4.2.1 *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının comet yöntemi ile sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) genotoksisitelerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Sitotoksisite değerlendirmeleri sonrasında her iki hücre hattı üzerinde sitotoksik olmayan konsantrasyonlar (10, 25, 50, 100 µg/ml) seçilerek DNA hasar oranlarının tayin edilebildiği bir genotoksisite testi olan comet testi analizlerine geçilmiştir.

Inula viscosa'nın sağlıklı akciğer (BEAS-2B) hücrelerinde DNA hasarına karşı etkileri kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2'de ve Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

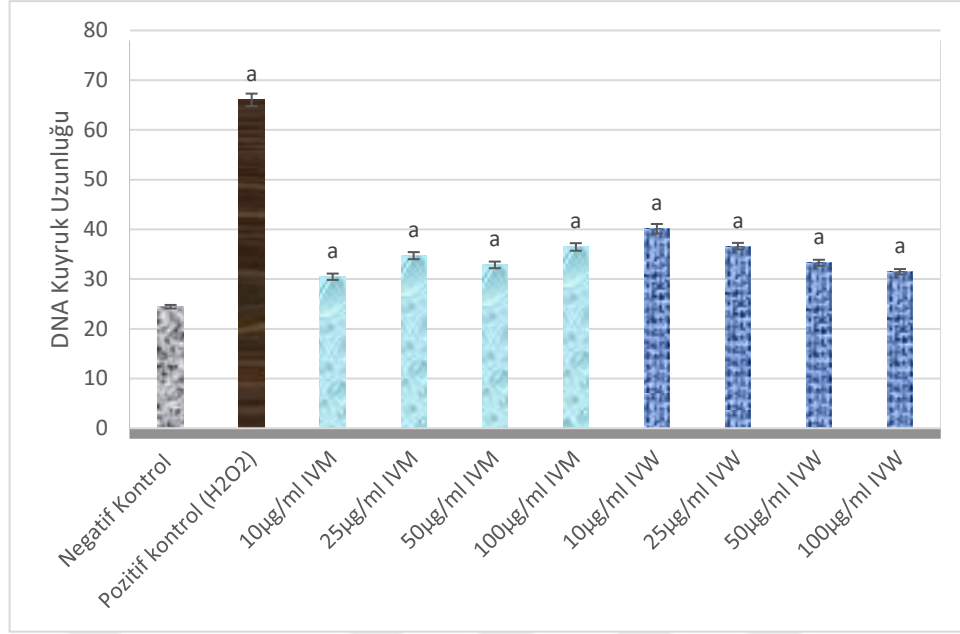
Inula viscosa'nın her bir ekstraktı (IVM ve IVW) için 4 farklı konsantrasyonunun (10, 25, 50, 100 µg/ml) sağlıklı akciğer hücrelerine uygulanması sonrasında, negatif kontrole kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlendirmesinde DNA hasarı oluşturduğu; DNA kuyruk uzunluğu parametresini kapsayan tüm konsantrasyonlarda ve pozitif kontrolde istatistiksel olarak önemli bir artış gözlenirken; kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinin bazı konsantrasyonlarında ve pozitif kontrollerinde istatistiksel olarak önemli artışa neden olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Çizelge 4.2: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular. *

	Kuyruk Uzunluğu ±standart hata	Kuyruk Yoğunluğu ±standart hata	Kuyruk Momenti ±standart hata
Negatif Kontrol	24,44±0,35	3,31±0,39	0,39±0,04
Pozitif kontrol (50µM H₂O₂)	66,03±1,26 ^a	41,75±1,50 ^a	13,07±0,63 ^a
10µg/ml IVM	30,47±0,63 ^a	7,42±0,65 ^a	1,22±0,13
25µg/ml IVM	34,71±0,71 ^a	8,86±0,69 ^a	1,60±0,17
50µg/ml IVM	32,85±0,67 ^a	7,84±0,80 ^a	1,65±0,30
100µg/ml IVM	36,46±0,76 ^a	7,96±0,56 ^a	1,33±0,12
10µg/ml IVW	40,12±0,95 ^a	12,07±0,78 ^a	2,34±0,19 ^a
25µg/ml IVW	36,61±0,66 ^a	8,36±0,82 ^a	1,47±0,22
50µg/ml IVW	33,27±0,6 ^a	5,30±0,42	0,79±0,06
100µg/ml IVW	31,47±0,54 ^a	5,84±0,73	0,93±0,16

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart sapma olarak verilmiştir.

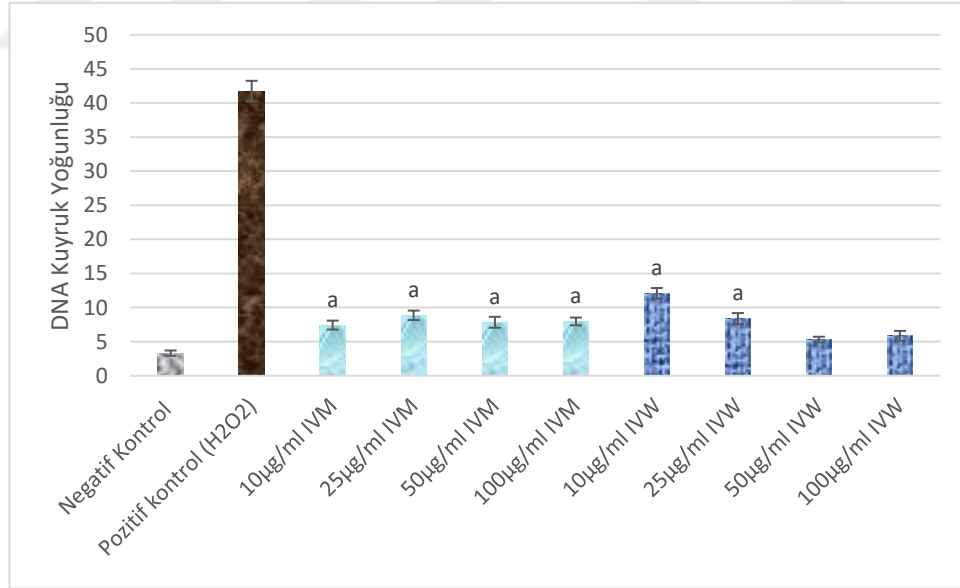
^a Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.6: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri. *

* Üç çalışmanın ortalama değerleri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

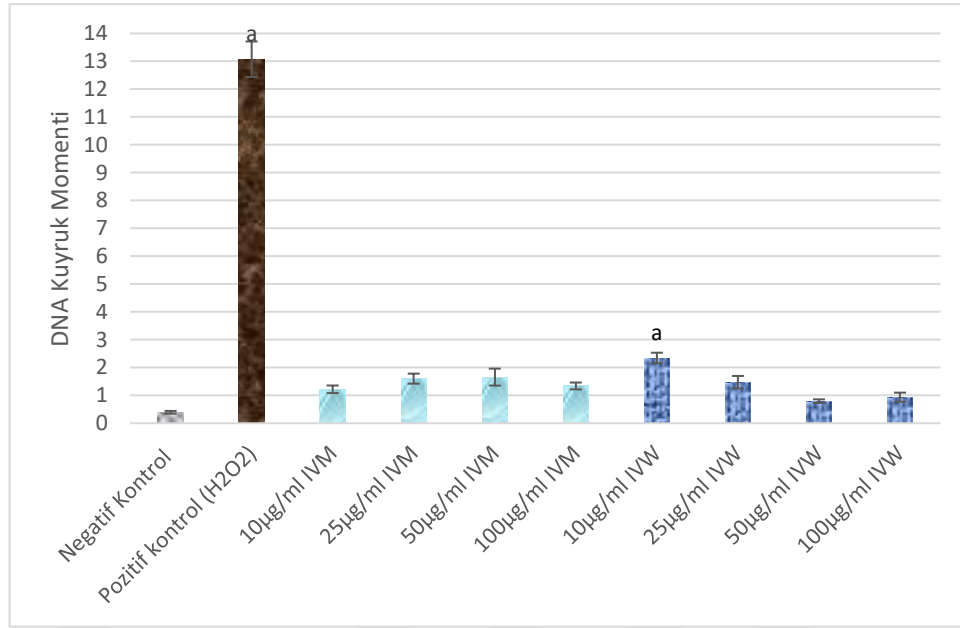
^a Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı



Şekil 4.7: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri. *

* Üç çalışmanın ortalama değerleri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı



Şekil 4.8: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) comet kuyruk momenti üzerine etkileri. *

* Üç çalışmanın ortalama değerleri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

4.2.2 *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının comet yöntemi ile kanserli akciğer hücrelerinde (A549) genotoksisitelerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Inula viscosa'nın kanserli akciğer (A549) hücrelerinde DNA hasarına karşı etkileri kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3'de ve Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

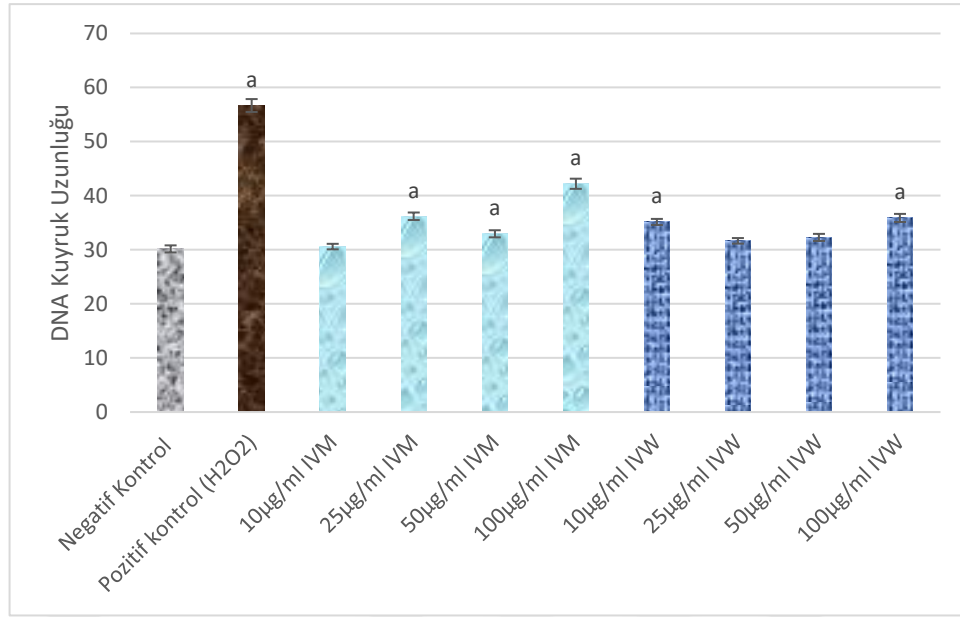
Inula viscosa'nın her bir ekstraktı (IVM ve IVW) için 4 farklı konsantrasyonunun (10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) kanserli akciğer (A549) hücrelerine uygulanması sonrasında, negatif kontrole kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlendirmesinde DNA hasarı oluşturduğu; DNA kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu parametrelerinin bazı konsantrasyonlarında ve pozitif kontrollerinde istatistiksel olarak önemli artışa neden olurken, kuyruk momenti parametresinde pozitif kontrol dışında istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmamıştır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.3: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının kanserli akciğer hücrelerinde (A549) DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular. *

	Kuyruk Uzunluğu ±standart hata	Kuyruk Yoğunluğu ±standart hata	Kuyruk Momenti ±standart hata
Negatif Kontrol	30,16±0,65	8,26±0,96	1,46±0,24
Pozitif kontrol (H₂O₂)	56,67±1,19 ^a	32,23±1,48 ^a	8,98±0,57 ^a
10µg/ml IVM	30,59±0,51	6,82±0,67	1,16±0,16
25µg/ml IVM	36,20±0,69 ^a	12,28±0,78 ^a	2,00±0,16
50µg/ml IVM	32,95±0,65 ^a	8,32±0,70	1,36±0,16
100µg/ml IVM	42,20±0,93 ^a	12,22±0,69 ^a	2,23±0,13
10µg/ml IVW	35,14±0,56 ^a	9,58±0,74	1,64±0,14
25µg/ml IVW	31,65±0,51	9,29±0,63	1,41±0,11
50µg/ml IVW	32,28±0,65	9,55±0,87	1,71±0,22
100µg/ml IVW	35,88±0,74 ^a	12,99±0,95 ^a	2,36±0,25

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart sapma olarak verilmiştir.

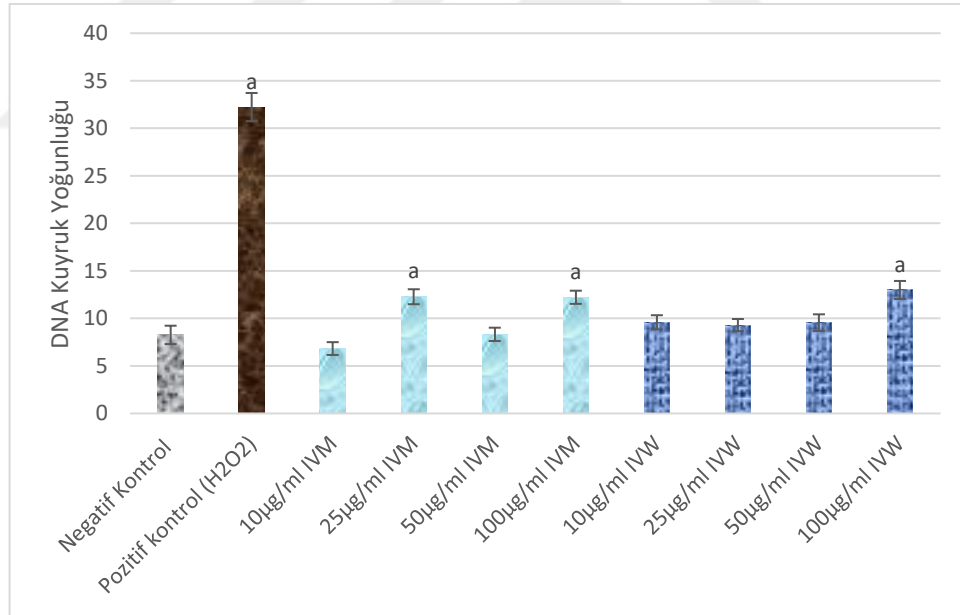
^a Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.9: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının kanserli akciğer hücrelerinde (A549) comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri. *

* Üç çalışmanın ortalama değerleri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

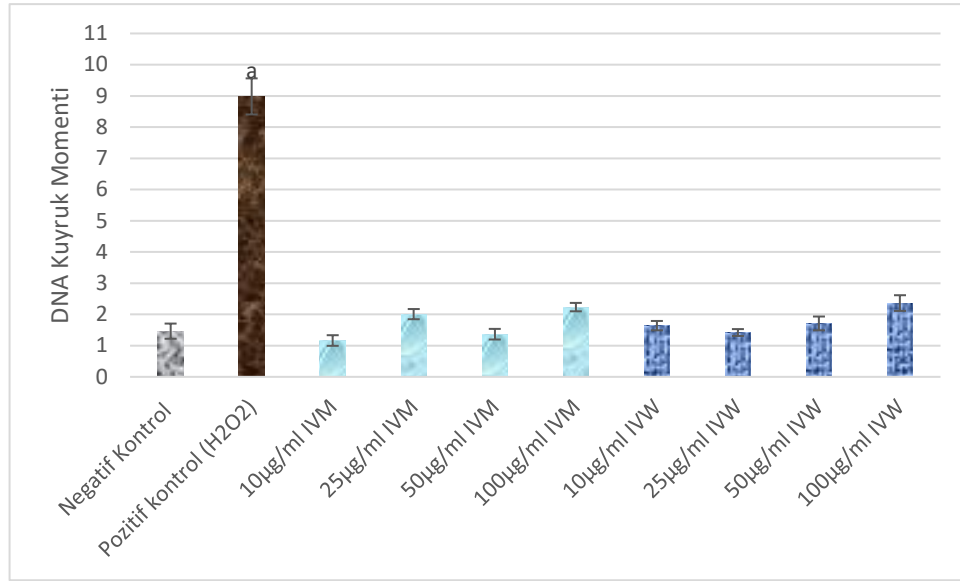
^a Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı



Şekil 4.10: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının kanserli akciğer hücrelerinde (A549) comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri. *

* Üç çalışmanın ortalama değerleri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı



Şekil 4.11: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının kanserli akciğer hücrelerinde (A549) comet kuyruk momenti üzerine etkileri. *

* Üç çalışmanın ortalama değerleri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

4.3 Antigenotoksisitenin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

4.3.1 *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının comet yöntemi ile sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) antigenotoksisitelerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Inula viscosa'nın BEAS-2B hücrelerinde H_2O_2 ile indüklenen DNA hasarına karşı etkileri kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.4'de ve Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14'de gösterilmiştir.

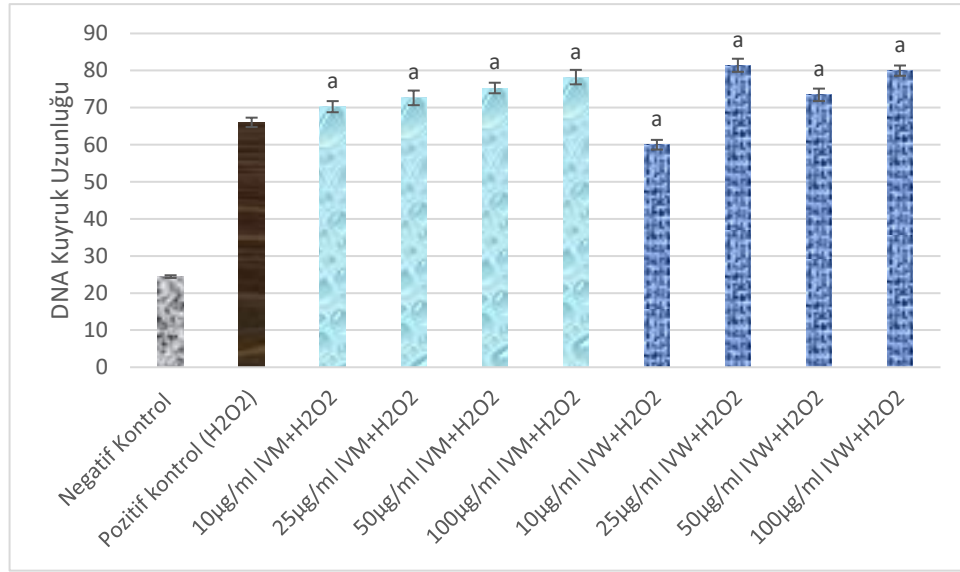
Inula viscosa muamelesinin ardından H_2O_2 uygulanan gruplar, tek başına H_2O_2 uygulanmış olan pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece kuyruk uzunluğu parametresinin su ekstraktının en düşük konsantrasyonunda ($10\mu g/ml$ IVW+ H_2O_2) DNA hasarında bir azalma olduğu yani koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Diğer parametrelerde ve konsantrasyonlarda koruyucu etki görülmemiştir.

Çizelge 4.4: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular. *

	Kuyruk Uzunluğu ±standart hata	Kuyruk Yoğunluğu ±standart hata	Kuyruk Momenti ±standart hata
Negatif Kontrol	24,44±0,35	3,31±0,39	0,39±0,04
Pozitif kontrol (50µM H₂O₂)	66,03±1,26	41,75±1,50	13,07±0,63
10µg/ml IVM+H₂O₂	70,25±1,50 ^a	53,88±1,76 ^a	18,18±0,87 ^a
25µg/ml IVM+H₂O₂	72,63±1,96 ^a	52,37±1,90 ^a	19,18±1,03 ^a
50µg/ml IVM+H₂O₂	75,29±1,42 ^a	54,80±1,55 ^a	18,37±0,72 ^a
100µg/ml IVM+H₂O₂	78,22±1,95 ^a	54,69±1,66 ^a	18,94±0,82 ^a
10µg/ml IVW+H₂O₂	59,99±1,30 ^a	46,84±1,49 ^a	12,87±0,55
25µg/ml IVW+H₂O₂	81,41±1,76 ^a	58,73±1,61 ^a	21,37±0,84 ^a
50µg/ml IVW+H₂O₂	73,44±1,67 ^a	51,10±1,52 ^a	16,82±0,74 ^a
100µg/ml IVW+H₂O₂	79,97±1,38 ^a	46,16±1,47 ^a	16,93±0,83 ^a

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart sapma olarak verilmiştir.

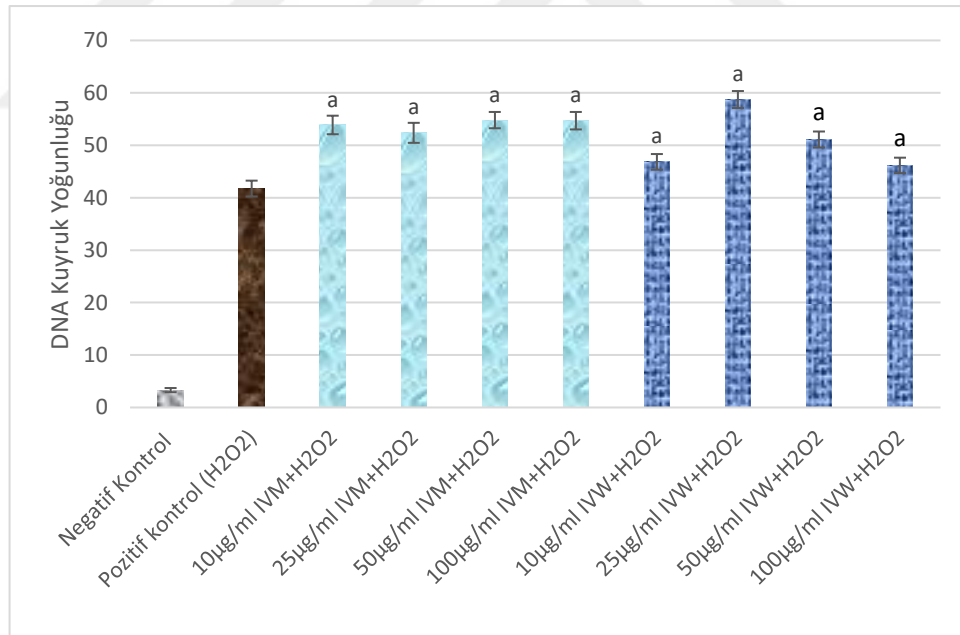
^a Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.12: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri. *

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart sapma olarak verilmiştir.

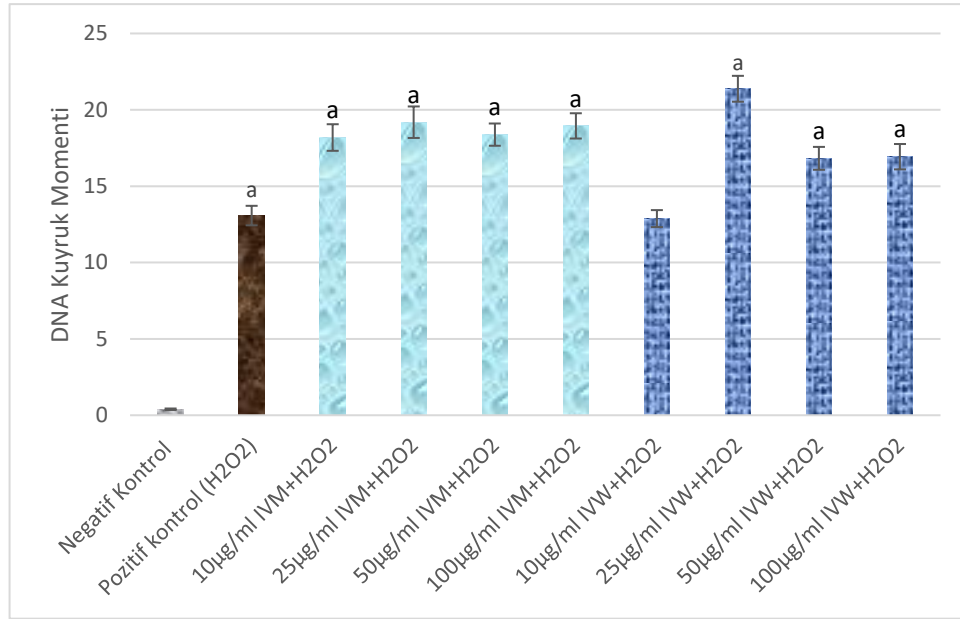
^a Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.13: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri. *

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.14: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) comet kuyruk momenti üzerine etkileri. *

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı

4.3.2 *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının comet yöntemi ile kanserli akciğer hücrelerinde (A549) antigenotoksisitelerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Inula viscosa'nın A549 hücrelerinde H₂O₂ ile indüklenen DNA hasarına karşı etkileri kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5'de ve Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17'de gösterilmiştir.

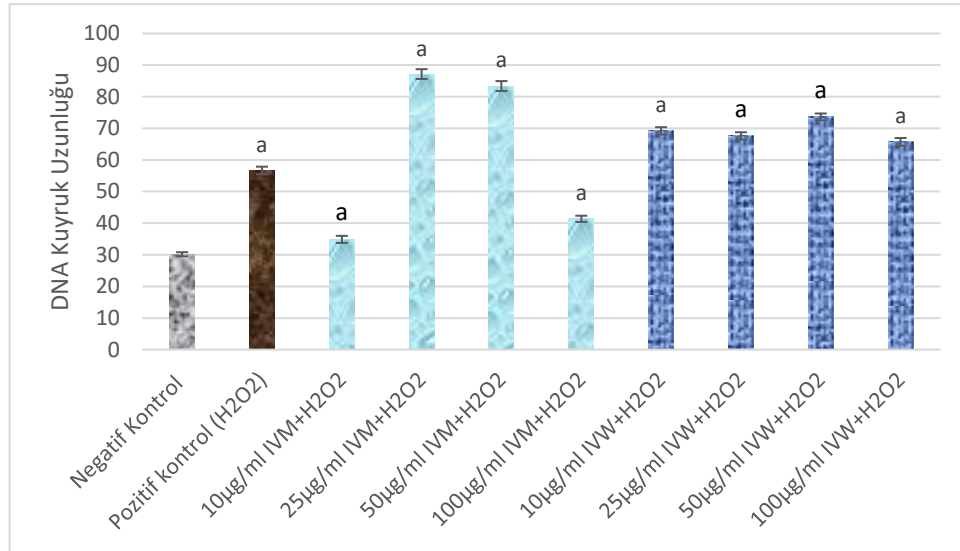
Inula viscosa muamelesinin ardından H₂O₂ uygulanan gruplar, tek başına H₂O₂ uygulanmış olan pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında kuyruk uzunluğu kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinin hepsinde metanol ekstraktının en düşük konsantrasyonunda (10µg/ml IVM+H₂O₂) ve en yüksek konsantrasyonunda (100µg/ml IVM+H₂O₂) DNA hasarında bir azalma olduğu yani koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Diğer konsantrasyonlarda koruyucu etki görülmemiştir.

Çizelge 4.5: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen kanserli akciğer hücrelerinde (A549) DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular. *

	Kuyruk Uzunluğu ±standart hata	Kuyruk Yoğunluğu ±standart hata	Kuyruk Momenti ±standart hata
Negatif Kontrol	30,16±0,65	8,26±0,96	1,46±0,24
Pozitif kontrol (50µM H₂O₂)	56,67±1,19	32,23±1,48	8,98±0,57
10µg/ml IVM+H₂O₂	34,87±1,11 ^a	19,02±1,23 ^a	3,98±0,33 ^a
25µg/ml IVM+H₂O₂	87,15±1,54 ^a	58,51±1,69 ^a	22,05±0,87 ^a
50µg/ml IVM+H₂O₂	83,37±1,56 ^a	50,01±1,61 ^a	18,54±0,90 ^a
100µg/ml IVM+H₂O₂	41,37±0,98 ^a	27,09±1,59 ^a	6,02±0,47 ^a
10µg/ml IVW+H₂O₂	69,17±1,16 ^a	52,33±1,62 ^a	16,14±0,65 ^a
25µg/ml IVW+H₂O₂	67,58±1,17 ^a	57,60±1,58 ^a	17,73±0,68 ^a
50µg/ml IVW+H₂O₂	73,58±1,11 ^a	58,90±1,20 ^a	18,40±0,56 ^a
100µg/ml IVW+H₂O₂	65,70±1,21 ^a	56,71±1,32 ^a	15,98±0,55 ^a

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart sapma olarak verilmiştir.

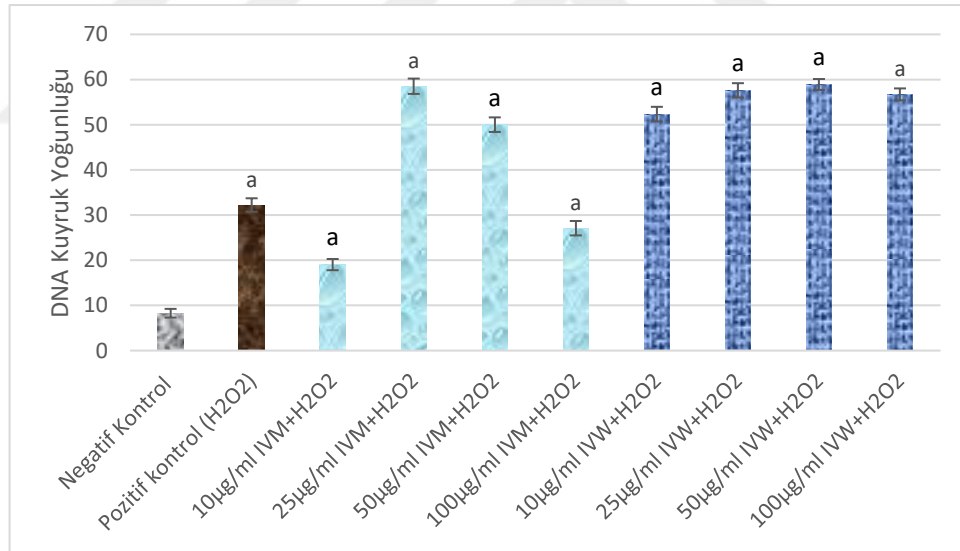
^a Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.15: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H_2O_2 ile oksidatif hasar indüklenen kanserli akciğer hücrelerinde (A549) comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri. *

* Üç çalışmanın ortalama değerleri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

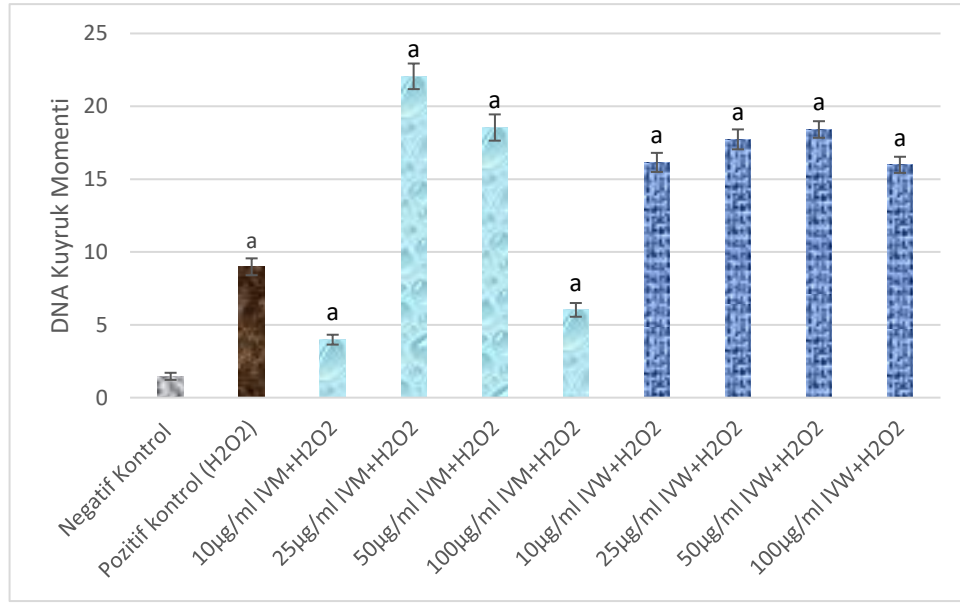
^a Pozitif kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı



Şekil 4.16: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H_2O_2 ile oksidatif hasar indüklenen kanserli akciğer hücrelerinde (A549) comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri. *

* Üç çalışmanın ortalama değerleri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Pozitif kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı



Şekil 4.17: *Inula viscosa* bitkisinin metanol (IVM) ve su (IVW) ekstraktlarının H_2O_2 ile oksidatif hasar indüklenen kanserli akciğer hücrelerinde (A549) comet kuyruk momenti üzerine etkileri. *

* Üç çalışmanın ortalama değerleri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Pozitif kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

5. TARTIŞMA

Günümüzde geleneksel tıp, dünyanın birçok yerinde alternatif tedavi biçimi olarak tercih edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın verilerine göre insan popülasyonunun %65'i alternatif bir tedavi biçimi olan geleneksel tıbbı, hastalıkların tedavisinde öncelikli olarak tercih etmektedir.

Geleneksel tıbbın içeriğini oluşturan doğal ürünlerin; yüksek etkinlik ve düşük toksisiteye sahip olması dolayısıyla antikanser aktivite gösteren ürünler arasında olduğu kabul edilmektedir. Hali hazırda kanser tedavisinde kullanılan ilaçların %60'dan fazlasının doğal ürünlerden izole edilen içeriklerden oluştuğu ve birçoğunun da bitkisel kaynaklı olduğu bilinmektedir (Ma ve Wang, 2009; Gordaliza, 2007). Geleneksel tıpta kullanılan bitki ekstraktlarının ve bu ekstraktların barındırdığı fenolik bileşiklerin kanser tedavisinde antikanser ajan olarak kullanımı üzerine literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Dünyanın birçok ülkesinde toksisite oluşturmeyen bitki ekstraktları, kanser tedavisine ortak alternatif bir tedavi olarak kullanılmaktadır (Patil, 2013).

Günümüzde halen bazı bitkisel ekstraktların ve antikanser özellik gösteren antioksidan kaynaklı ajanların insan sağlığı üzerinde oluşabilecek olası toksisitelerine ilişkin yeterli bilgi bulunmamaktadır. Antioksidan aktivite gösteren bitkisel kaynaklı ürünler, reaktif oksijen bileşiklerinin neden olabileceği olası DNA hasarının ve oluşabilecek diğer radikal hasarların tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Bitki ekstraktlarının prooksidan/antioksidan etkisi, serbest radikal tutma aktivesi ile bitkinin fitokimyasal bileşenlerinin indirgeme gücü arasındaki dengeden kaynaklanmaktadır. Yani, bir bitki düşük konsantrasyonlarda antioksidan etki gösterebiliyorken aynı bitkinin yüksek konsantrasyonları prooksidan etki gösterebilmektedir. Bu yüzden, antikanser ajan olarak kullanılacak olan bitkisel ajanların kimyasal özelliklerinin ve toksik etkilerinin tam olarak belirlenmesi gerekmektedir (Jamieson ve diğ, 2014; Hadi ve diğ, 2007).

Inula viscosa; *Inula* cinsine ait yaklaşık 100 türden yalnızca biri olan ve sitotoksik etkisi kanıtlanmış bir bitkidir (Rozenblat ve diğ, 2008). *Inula viscosa* bitkisinin çeşitli ekstraktlarının sağlıklı ve kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik ve antiproliferatif

özellikleri araştırılmıştır, genotoksik etki ise yalnızca *Allium* testi ile soğan kök meristem hücreleri üzerinde incelenmiş olup (Çelik ve Aslantürk, 2010) literatür araştırmalarında *I.viscosa* bitkisinin genotoksik etkisi ile ilgili rastlanılan tek çalışmanın bu çalışma olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca olası DNA hasarına karşın, *Inula viscosa* bitkisinin antigenotoksik etkisinin olup olmadığını araştıran hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Inula viscosa bitkisine dair literatürde yer alan açıklıklar dikkatle ve kapsamlı bir araştırmayla belirlenerek, bu tez çalışmasında *Inula viscosa* bitkisinin su ve metanol ekstraktları olmak üzere iki farklı ekstraktının daha önce çeşitli kanser hücreleri üzerinde denenen sitotoksik etkisi, ilk defa akciğer kanser hattı (A549) üzerinde araştırılmıştır. Hücre canlılığının karşılaştırılması için akciğer kanser hücre hattı (A549)'na karşın sağlıklı akciğer hücre hattı (BEAS-2B) tercih edilmiştir. Sitotoksik olmayan konsantrasyonlar belirlendikten sonra, *Inula viscosa* bitkisinin su ve metanol ekstraktlarının genotoksik etkisi ilk defa memeli hücre kültürü olan BEAS-2B ve A549 hücre hatları üzerinde incelenmiştir. Son olarak ise, BEAS-2B ve A549 hücre hatları üzerinde oluşturulan DNA hasarına karşın *Inula viscosa* bitkisinin su ve metanol ekstraktlarının koruyuculuğu olup olmadığının araştırılması antigenotoksisite incelemesi kapsamında yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında, öncelikle Manisa'nın Akhisar ilçesinden toplanan ve kurutulan *Inula viscosa* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarından su ve metanol kullanılarak ekstraksiyon yapılmıştır. Kamer Çolak'ın yapmış olduğu çalışmada *Inula viscosa*'nın su ve metanol olmak üzere iki şekilde ekstraksiyonu gerçekleştirildikten sonra, elde edilen özütlerin kromatografik analizi yapılmıştır. Analizlere göre su özütünün metanol özütüne göre daha fazla fenolik bileşiği içerisinde çözdüğü ve toplamda 6 kat daha fazla antioksidan kapasiteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Kamer Çolak, 2019). Bu çalışmadaki bilgiler ışığında, *Inula viscosa*'nın su ve metanol ekstraktları hazırlanmış olup karşılaştırmalı olarak hangi ekstraktın A549 hücre hattı üzerinde daha iyi proliferatif etkiye sahip olduğu ve literatürle tutarlı olup olmadığı incelenmiştir.

Bu tez çalışmasında *Inula viscosa* bitki ekstraktları hazırlandıktan sonra, konsantrasyon belirleme aşamasına geçilmiştir. Bugüne kadar *I.viscosa* ile ilgili yapılan sitotoksite ve antiproliferatif etkiyi içeren çalışmalar incelendiğinde; çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki yaklaşık IC₅₀ değerleri baz alınarak konsantrasyon aralığı belirlenmiştir. Bu değerler rahim ağzı kanseri SiHa ve HeLa hücre hatlarına karşı yaklaşık 50 µg/ml, meme kanseri hücre hatlarına karşı yaklaşık 150 µg/ml, kolon

kanseri HTC116 ve Colo320 hücrelerinde yaklaşık 300 µg/ml, glioblastoma T98-G hücre hattı üzerinde yaklaşık 120 µg/ml, cilt kanseri A2058 ve MeWo hücrelerinde ise yaklaşık 60 µg/ml'dir. Bu konsantrasyonları içeren aralık göz önüne alınarak sağlıklı akciğer hücre hattı BEAS-2B ve kanserli akciğer A549 hücre hattı için düşük ve yüksek konsantrasyonları da içeren konsantrasyon aralığı 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/ml olarak belirlenmiştir (Benbacer ve diğ, 2012; Messaousi ve diğ, 2016; Bar-Shalom ve diğ, 2019; Ozkan ve diğ, 2019; Kamer Çolak ve diğ, 2020).

Hücre hatlarında gerçekleştirilen ilk analiz olan Nötral kırmızı alım yöntemi (NKA) bulgularının Şekil 4.1 ve Şekil 4.2' deki sonuçlarına göre; su ve metanol ekstraktlarının her ikisinde de 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarda sitotoksik etki gözlenirken; 10, 25, 50 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda sitotoksik etki gözlenmemiştir. Ayrıca, metanol ekstraktını içeren Şekil 4.1 incelendiğinde 7 farklı konsantrasyonun hepsinde BEAS-2B hücre canlılığı A549 hücre canlılığından fazladır. Bu sonucu göre, *Inula viscosa*'nın metanol ekstraktının sitotoksik etkisinin A549 hücre hattında BEAS-2B hücre hattına kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, su ekstraktını içeren Şekil 4.2 incelendiğinde, sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda (10, 25, 50 ve 100 µg/ml) hücre canlılığı BEAS-2B hücre hattında A549 hücre hattına kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her iki ekstrakta da baktığımızda 10-100 µg/ml'lik spesifik konsantrasyon aralığında BEAS-2B hücre canlılığının kanserli hücre hattı olan A549 hücre canlılığından daha fazla olduğu görülmektedir. Bu da, *Inula viscosa*'nın antikanser ajan olarak kullanılabileceğini ve yapılan literatürdeki diğer çalışmalarla tutarlı sonuç verdiğini göstermektedir.

Inula viscosa'nın metanol ekstraktının NKA yöntemine göre IC₅₀ değeri BEAS-2B hücreleri için 178,65 µg/ml olarak, A549 hücreleri için ise 119,37 µg/ml olarak belirlenirken; *Inula viscosa*'nın su ekstraktının NKA yöntemine göre IC₅₀ değeri BEAS-2B hücreleri için 206,07 µg/ml olarak, A549 hücreleri için ise 215,86 µg/ml olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.1'deki IC₅₀ sonuçlarını kıyasladığımızda metanol ekstraktının su ekstraktına kıyasla her iki hücre hattında da NKA yöntemine göre daha düşük IC₅₀ değerine sahip olduğu görülmektedir. Bu da kromatografik analiz sonucu tespit edilen metanol ekstraktının fenolik bileşenlerin antiproliferatif özelliklerinin daha yüksek olduğunun ve daha yüksek antioksidan seviyesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu bilgilere ek olarak, Şekil 4.5'de *Inula viscosa*'nın metanol ekstraktının su ekstraktına

kıyasla A549 hücre hattı üzerinde daha iyi antiproliferatif etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Sitotoksikite testleri arasında NKA yönteminin sonuçlarını kıyaslamak için ikinci bir analiz olarak MTT testi yapılarak sitotoksik etki araştırılmıştır. Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'deki sonuçlar incelendiğinde; 10-100 µg/ml aralığındaki uygulama konsantrasyonlarında hücre canlılığı üzerine sitotoksik etki gözlenmezken, 250-1000 µg/ml konsantrasyonu aralığında sitotoksik etki gözlenmiştir. 100 µg/ml konsantrasyonu itibariyle hem BEAS-2B hücrelerinin hem de A549 hücrelerinin canlılığı %50'nin altına düşmüştür (Şekil 4.4). Ayrıca, sitotoksik etki gösteren konsantrasyonlar haricinde geriye kalan konsantrasyonlarda yüzde BEAS-2B hücre canlılığı yüzde A549 hücre canlılığından fazladır. *Inula viscosa*'nın MTT yöntemine göre IC₅₀ değerlerini Çizelge 4.5'e göre kıyaslayacak olursak; A549 hücre hattı üzerinde metanol ekstraktının IC₅₀ değeri 84,62 µg/ml ile su ekstraktının IC₅₀ değeri 93,6 µg/ml'ya kıyasla daha düşük olduğundan dolayı, metanol ekstraktı NKA yöntemindeki gibi A549 hücre hattı üzerinde daha iyi antiproliferatif etki göstermiştir.

Bu tez çalışması dahilinde yapılan sitotoksikite sonuçlarına göre *Inula viscosa* bitkisinin metanol ekstraktının kanserli akciğer A549 hücre hattı üzerinde su ekstraktına göre daha iyi antiproliferatif etki göstermesinin sebepleri arasında metanol ekstraktının su ekstraktına göre daha fazla terpenoid, flavonoid ve seskiterpen laktonlarından inulaviscolid ve tomentosin gibi aktif bileşene sahip olabileceği ve bu aktif bileşenlerin farklı hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisinin olup hücrelerde apoptatik yolları düzenleyici etkisi olduğu düşünülmüştür (Boyd, 1997; Scalbert ve diğ, 2005; Lee ve diğ, 2019).

Ayrıca, 10-100 µg/ml konsantrasyon aralığında her iki yöntemde de BEAS-2B hücre canlılığının A549 hücre canlılığından yüksek olmasının sebepleri arasında, *Inula viscosa* bitkisinin A549 hücre hattı üzerindeki apoptatik yolların düzenlenmesini tetikliyor olabileceği gibi hücre siklusunun düzenlenmesinde de etkili olabileceği üzerinde yapılan çalışmalar değerlendirilmiştir (Khan ve diğ, 2006; Bar-Shalom ve diğ, 2019).

Bu bilgilere ek olarak, literatürde sitotoksikite çalışmaları için, belirlenen IC₅₀ değerinin 100 µg/ml'nin altında çıkmasının çalışılan bitkinin kayda değer sitotoksik etki gösterdiğinin kanıtı olarak değerlendirilebileceği vurgulanmıştır (Boyd, 1997; Ozkan ve diğ, 2019). Çizelge 4.1'deki MTT yöntemi ile tayin edilen sitotoksikite

sonuçları incelendiğinde, *Inula viscosa* bitkisinin metanol ve su ekstraktlarının A549 hücre hattı üzerinde seçici sitotoksik etki gösterdiği sonucu dikkat çekmektedir. BEAS-2B hücre hattı üzerinde 100 µg/ml’ den büyük çıkan IC₅₀ değerleri, A549 hücre hattı üzerinde sırası ile 84,62 µg/ml ve 93,6 µg/ml olduğu görülmektedir. Yani, BEAS-2B’ nin canlılığının %50’den fazla olduğu konsantrasyon aralığında; A549 hücrelerinin canlılığı %50’nin altına düşmüştür. Bu durum, *Inula viscosa* bitkisinin kanserli akciğer A549 hücreleri için antikanser ajan olarak kullanılabileceği yönünde değerlendirilmiştir.

Mevcut tez çalışması kapsamında, sitotoksik etkinin tayini ile elde edilen veriler ışığında; genotoksik ve antigenotoksik etkinin analizini yapmak üzere *Inula viscosa* bitkisinin su ve metanol ekstraktlarının sitotoksik olmayan 10, 25, 50 ve 100 µg/ml’lık konsantrasyonları kullanılarak BEAS-2B ve A549 hücre hatları üzerinde DNA hasarının tespiti ve H₂O₂ tarafından oluşturulan DNA hasarına karşı koruyuculuğu olup olmadığının araştırılması için Comet testi uygulanmıştır. Comet testi özellikle son yıllarda hücrelerde oksidatif kaynaklı durumların neden olduğu genetik hasarın ve antioksidan aktivite gösteren bitkisel kaynaklı ürünler tarafından oluşturulan iyileştirici/koruyucu cevapların belirlenmesi için hızlı ve etkin bir yöntem olarak tercih edilmektedir (Anderson, 1996).

Inula viscosa bitkisinin genotoksik etkisinin araştırıldığı tek çalışma olan Çelik ve Aslantürk’ün çalışmasında; bitki ekstresinin 2.5 mg/ml, 5mg/ml, ve 10 mg/ml’lık yüksek konsantrasyonlarının *Allium cepa* kök ucu meristem hücreleri üzerindeki etkisi kromozomal aberasyon ve mikroçekirdek yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, kromozomal aberasyon ve mikroçekirdek oluşum sayısının önemli ölçüde indüklenmiş olduğu görülmektedir. *Allium* testi sonuçlarına göre kök ucu hücrelerinde kromozom fragmanları oluşmuş, yapışkan metafaz ve polar sapmalar da gözlenmiştir. Sonuç olarak, toplam anormal hücre sayısında negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sebep olduğu görülmüştür (Çelik ve Aslantürk, 2010).

Bu tez çalışmasında, sitotoksikite analizi için belirlenmiş olan 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/ml’lık konsantrasyonlardan sitotoksik etkinin görüldüğü konsantrasyonlar elenerek, hücre canlılığının %50’nin üzerinde olduğu 10, 25, 50 ve 100 µg/ml’lık konsantrasyonlar seçilerek hem BEAS-2B hem de A549 hücreleri üzerindeki genotoksik etki comet testi kullanılarak kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve

kuyruk momenti parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 incelendiğinde *Inula viscosa* bitkisinin su ve metanol ekstraktlarının BEAS-2B hücre hattı üzerinde kuyruk uzunluğu açısından tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiği ve DNA hasarına sebep olduğu sonucuna varılırken; kuyruk yoğunluğu parametresinde metanol ekstraktının tüm konsantrasyonlarında ve su ekstraktının 10 ve 25 µg/ml'lik konsantrasyonlarında negatif kontrole göre anlamlı artış gösterdiği belirlenmiştir. Kuyruk momenti parametresi açısından ise sadece su ekstraktının 10 µg/ml'lik konsantrasyonu negatif kontrole göre anlamlı artışa sebep olmuştur. Sonuç olarak *Inula viscosa* bitkisinin BEAS-2B hücre hattı üzerinde genotoksik hasara sebep olduğu görülmektedir. Romero-Jimenez ve arkadaşları çeşitli bitkiler üzerinde yapmış olduğu genotoksisite ve antigenotoksisite çalışmaları sonucunda; incelenen bitkiler arasındaki çoğu bitkinin genotoksik etkiye sahip olmadığı sonucuna varırken, halk arasında kedi otu olarak bilinen *Valeriana officinalis* bitkisinin insan endotel hücreleri üzerinde DNA hasarı oluşturduğu yani genotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Romero- Jimenez ve diğ, 2005).

Inula viscosa bitkisinin su ve metanol ekstraktlarının A549 hücreleri üzerindeki genotoksik etkisine baktığımızda, Çizelge 4.3 ve Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 incelendiğinde; kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu parametrelerine göre su ve metanol ekstraktların yüksek konsantrasyonlarında (100 µg/ml) negatif kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiği yani DNA hasarına sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan genotoksik etkinin güçlü bir antioksidan olduğu bilinen *Inula viscosa* bitkisinin prooksidan etkisinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (Jamieson ve diğ, 2014; Hadi ve diğ, 2007). *Inula viscosa* bitkisinin A549 hücre hattı üzerinde böyle bir genotoksik etki göstermesi kanser hücrelerinin doğası gereği değişik metabolik yollara sahip olması ile de açıklanabilmektedir. Sitotoksik etkinin gözlenmediği 10-100 µg/ml konsantrasyon aralığında genotoksik etkinin yüksek konsantrasyonlarda görülmesi A549 hücrelerinin antiproliferasyonu açısından beklenen ve istenilen bir sonuçtur. Zhou ve arkadaşlarını geleneksel tıpta kullanılan bitkilerin içeriğinde bulunan bitkisel ajanların, biyolojik açıdan aktive olarak DNA hasarı yoluyla kanser gelişimini destekleyebileceğini ve bunun da genotoksisisteye sebep olabileceğini savunmuşlardır (Zhou ve diğ, 2003).

Bu tez çalışmasının antigenotoksisite deneyleri kapsamında; *Inula viscosa* bitkisinin su ve metanol ekstraktlarının BEAS-2B hücreleri üzerindeki antigenotoksik etkisi Çizelge 4.4 ve Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14 aracılığıyla incelendiğinde; oluşturulan hasara karşı koruyuculuğun olmadığı görülmektedir. Aynı şekilde Çizelge 4.5 ve Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17 incelendiğinde, *Inula viscosa* bitkisinin A549 hücre hattı üzerinde metanol ekstraktının her üç parametreye göre de en düşük (10 µg/ml) ve en yüksek (100 µg/ml) konsantrasyonlarında koruyuculuğunun olduğu sonucuna varılmaktadır. Mustapha ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmalarda fenolik bileşiklerin kanser hücreleri üzerinde DNA hasarını azalttığını comet testini kullanarak göstermişlerdir (Mustapha ve diğ, 2014). Bu bilgi ışığında, *Inula viscosa* bitkisinin metanol ekstraktının yapısında bulunan fenolik kaynaklı bileşenlerden dolayı kanserli akciğer A549 hücrelerini H₂O₂ oksidatif stresine karşı koruyucu etki sağladığı görülmektedir. Ayrıca Sassi ve arkadaşları, kan kanseri (lösemi) L1210 hücre hattı üzerinde halk arasında keçi boynuzu yaprağı olarak bilinen *Ceratonia siliqua* L. ekstraktının genotoksik ve antigenotoksik etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak, önemli bir genotoksik etki tespit edilmezken, *Ceratonia siliqua* L. ekstraktının L1210 kan kanseri hücre hattı üzerinde H₂O₂ tarafından indüklenen DNA hasarını azalttığı görülmüştür (Sassi ve diğ, 2016). Böylelikle, *Inula viscosa* bitkisi de literatüde çalışması yapılan diğer fenolik kapasiteli bitkiler ve bitkisel ajanlar gibi A549 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkisinin yanında, antigenotoksik açıdan DNA hasarını azaltıcı etkisiyle akciğer kanserinin tedavisinde etkili olabilecek iyi bir bitkisel adaydır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitkilerin ya da bitkisel kaynaklı ürünlerin geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde ya da hastalıkların önlenmesinde kullanıldığı bilinmektedir. Bitkilerin, bitkisel kaynaklı ürün ve ajanların içeriğinde yer alan fenolik yapıli bileşikler, onların antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar kapasitelerini arttırmakta ve çeşitli hastalıklara karşı koruyucu işlevi görmelerini sağlamaktadır. *Inula viscosa* bitkisi de başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bir bitkidir.

Bu tez çalışmasında, *Inula viscosa* bitkisinin su ve metanol ekstraktlarının sağlıklı akciğer (BEAS-2B) ve kanserli akciğer (A549) hücre hatları üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve oksidatif hasara neden olan hidrojen peroksit (H₂O₂) karşı antigenotoksik etkileri açısından araştırılmıştır. Bunun sonucunda, her iki hücre hattında da 10-100 µg/ml konsantrasyon aralığında sitotoksik etki gözlenmezken, 250-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında sitotoksik etki gözlenmiştir. Sitotoksik etkinin gözlenmediği 10-100 µg/ml konsantrasyon aralığında, BEAS-2B hücre canlılığı A549 hücre canlılığında fazladır. Ayrıca, *Inula viscosa* bitki ekstraktlarından metanol ekstraktı A549 hücre hattı üzerinde BEAS-2B hücre hattına kıyasla daha iyi antiproliferatif etki göstermiştir. Diğer yandan, *Inula viscosa*'nın her iki hücre hattı üzerinde genotoksik etki gösterdiği, BEAS-2B hücre hattı üzerinde antigenotoksik etkinin bulunmadığı fakat A549 hücre hattı üzerinde metanol ekstraktının antigenotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. *Inula viscosa* bitkisinin metanol ekstraktının A549 hücre hattı üzerinde BEAS-2B hücre hattına kıyasla daha fazla sitotoksik etki ya da daha iyi antiproliferatif etki göstermesi ve A549 hücre hattı üzerinde görülen antigenotoksik etki, *Inula viscosa* bitkisinin metanol ekstraktının akciğer kanserinin tedavisinde kullanılmaya aday iyi bir bitkisel kaynak olabileceği tezini doğurmuştur. Literatürde yapılan diğer çalışmalarda çeşitli kanser hatları üzerinde görülen *Inula viscosa* bitkisinin antiproliferatif ve antikanserojenik etkisi bir kez de bu çalışma ile doğrulanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında edinilen bilgiler in vitro deneyler sonucunda elde edilmiştir. Sonuçların tam anlamıyla uygulanabilir olabilmesi için in vitro deneylerin in vivo hayvan deneyleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca genotoksik ve antigenotoksik etki sonuçlarının birden fazla yöntemle tayin edilmesi ve sonuçların birbirlerini desteklemesi beklenmektedir. Ayrıca, *Inula viscosa* bitkisinin ekstraksiyonu aşamasında bitki içeriğinde ana bileşen olarak var olan izokostik asit, tomentosin ve inuviskoid'in varlığının kromatografik yöntemlerle analiz edilip deneylere bu şekilde devam edilebileceği düşünülmektedir. *Inula viscosa* ekstraktlarının insan sağlığına olan etkilerini belirlemek ve hücresel cevabın daha doğru yorumlanması için maruziyet süresi 24, 48 ve 72 zaman aralıklarıyla incelenmeli ve bileşenlere maruziyet süresi ve konsantrasyonu bu şekilde karşılaştırılarak değerlendirilmelidir. Ayrıca, sitotoksik etkinin ortaya çıkmasına sebep olan hücresel mekanizmalar belirlenerek ayrıntılı incelenmesine, madde muamelesi edilen konsantrasyonların daha ayrıntılı konsantrasyonlardan oluşturulmasına ve antigenotoksik etkinin A549 hücre hattı üzerinde tam anlamıyla analiz edilebilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abad, M. J., Guerra, J. A., Bermejo, P., Irurzun, A., & Carrasco, L. (2000).** Search for antiviral activity in higher plant extracts. *Phototherapy Research*, 14(8), 604-607.
- Abu Zarga, H. M., Hamed, M. E., Sabri, S. S., Voelter, W., & Zeller, K. P. (1998).** New sesquiterpenoids from the Jordanian medicinal plant *Inula viscosa*. *Journal of Natural Products*, 61(6), 798-800.
- Al-Dissi, N. M., Salhab, A. S., & Al-Hajj, H. A. (2001).** Effects of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 117-121.
- Al-Eisawi, D. M. (1982).** List of Jordan vascular plants. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung Munchen*, 18, 79-182.
- Al-Eisawi, D. M. (1998).** *Field guide to wild flowers of Jordan and neighboring countries*. Amman: Jordan University.
- Anderson, D. (1996).** Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, 350, 103-108.
- Andreoli, C., Gigante, D., & Nunziata, A. (2003).** A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicology in vitro*, 17(5), 587-594.
- Bacanlı, M., Taner G., Başaran A. A., ve Başaran, N. (2015).** Bitkisel Kaynaklı Fenolik Yapıdaki Bileşikler ve Sağlığa Yararlı Etkileri. *Türkiye Klinikleri Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 4(1), 9–16.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.
- Barile, F.A. (1994).** *Introduction to In Vitro Cytotoxicology Mechanisms and Methods*. Florida: CRC Press.
- Bar-Shalom, R., Bergman, M., Grossman, S., Azzam, N., Sharvit, L., & Fares, F. (2019).** *Inula viscosa* extract inhibits growth of colorectal cancer cells in vitro and in vivo through induction of apoptosis. *Frontiers in Oncology*, 9, 1-14.
- Benbacer, L., Merghoub, N., El Btaouri, H., Gmouh, S., Attaleb, M., Morjani, H., Amzazi, S., & El Mzibri, M. (2012).** Antiproliferative effect and induction of apoptosis by *Inula viscosa* L. and *Retama monosperma* L. extracts in human cervical cancer cells, in: Rajamanickam, R. (Ed.), *Topics on Cervical Cancer with an Advocacy for Prevention*, InTech, Rijeka, Croatia, 267-284.

- Borenfreund, E., & Puerner, J.A. (1985).** Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24 (2), 119-124.
- Boyd, M. R. (1997).** The NCI in vitro anticancer drug discovery screen: concept, implementation, and operation, in: Teicher, B.A. (Ed.), *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval*, Humana Press, Totowa, NJ; pp. 23-42.
- Bulychev, A., Trouet, A., & Tulkens, P. (1978).** Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts. *Experimental cell research*, 115(2), 343-355.
- Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2003).** Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2288–2294.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004).** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157-2184.
- Cemeli, E., Baumgartner, A., & Anderson, D. (2009).** Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research*, 681, 51-67.
- Collins, A. R. (2004).** The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249-261.
- Collins, A. R., Dobson, V. L., Duinska, M., Kennedy, G., & Stetina, R. (1997).** The comet assay, what can it really tell us?, *Mutation Research*, 375(2), 183-193.
- Cotelle, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Pommery, J., Wallet, J. C., & Gaydou, E. M., (1996).** Antioxidant properties of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(1), 35-43.
- Çelik, T. A., & Aslantürk, Ö. S. (2010).** Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of inula viscosa leaf extracts with Allium test. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Desai, A. G., Qazi, G. N., Ganju, R. K., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A. K., Bedi, Y. S., Taneja, S. C., & Bhat, H. K. (2008).** Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention. *Current Drug Metabolism*, 9(7), 581-591.
- Doğan, A. L., ve Güç, D. (2004).** Sinyal iletimi mekanizmalar ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2(35), 34–42.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & O'Neill, K. L. (1995).** The comet assay, a comprehensive review. *Mutation Research*, 339, 37-59.
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006).** In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160 (2), 171-177.
- Fraiser, L. H., Kanekal, S., & Kehrer, J.P. (1991).** Cyclophosphamide Toxicity: Characterising and Avoiding the Problem, *Drugs*, 42(5), 781-795.

- Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R., & Stratton, M. R. (2001).** Cancer and genomics. *Nature*, 409(6822), 850-852. doi: 10.1038/35057046.
- Gordaliza, M. (2007).** Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*, 9(12), 767-776.
- Halliwell, B. (1994).** Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet* 344 (8924),721-724.
- Hadi, S. M., Bhat, S. H., Azmi, A. S., Hanif, S., Sharmim, U., & Ullah, M. F. (2007).** Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. *Seminars in Cancer Biology*, 17, 370-376.
- International Agency for Research on Cancer, (2018).** *Lung cancer statistics*. <https://www.wcrf.org/dietandcancer/lung-cancer-statistics>.
- Jamieson, N., Sirdaarta, J., & Cocka, I. E. (2014).** The Anti-Proliferative Properties of Australian Plants with High Antioxidant Capacities Against Cancer Cell Lines. *Pharmacognosy Communications*, 4(4), 71-82.
- Kamer Çolak, D. (2019).** *Inula Viscosa Yapraklarından Elde Edilen Metanol Ve Su Özütlelerinin Malign Melanom Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Ve Antiproliferatif Etkilerinin Araştırılması*. (Yüksek lisans tezi). Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Kamer Çolak, D., Egeli U., Eryılmaz, I. E., Aybastier, O., Malyer, H., Cecener, G., & Tunca, B. (2021).** The Anticancer Effect of *Inula viscosa* Methanol Extract by miRNAs' Re-regulation: An *in vitro* Study on Human Malignant Melanoma Cells. *Nutrition and cancer*, 1–14. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1869791>
- Khan, N., Afaq F., Saleem, M., Ahmad, N., & Mukhtar H. (2006).** Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Research*, 66(5). 2500–2505.
- Kheyar-Kraouche, N., Bento da Silva, A., Teresa Serra, A., Bedjou, F., & Bronze, M.R. (2018).** Characterization by liquid chromatography–mass spectrometry and antioxidant activity of an ethanolic extract of *Inula viscosa* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 156, 297-306.
- Komissarova, E. V., Saha, S. K., & Rossman, T. G. (2005).** Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(1), 99-107.
- Lounis, H., Bergheim, I., Bouhaimi, A., Marie Guignon, J., & Belhamel, K. (2018).** Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Inula viscosa* and *Senecio anteuphorbium*. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18(3), 225-236.
- Lee, C. M., Lee, J., Nam, M. J., Choi, Y. S., & Park, S. H. (2019).** Tomentosin Displays Anti-Carcinogenic Effect in Human Osteosarcoma MG-63 Cells via the Induction of Intracellular Reactive Oxygen Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1508.

- Ma, X., & Wang, Z. (2009).** Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug Discovery Today*, 14, 1136-1142.
- Merghoub, N., El Btaouri, H., Benbacer, L., Gmouh, S., Trentesaux, C., Brassart, B., Terryn, C., Attaleb, M., Madoulet, C., Benjouad, A., Amzazi S., El Mzibri, M., & Morjani, H. (2016).** Inula viscosa extracts induces telomere shortening and apoptosis in cancer cells and overcome drug resistance. *Nutritional Cancer*, 68(1), 131-143.
- Merghoub, N., Benbacer, L., Amzazi, S., Morjani, H., & El Mzibri, M. (2009).** Cytotoxic effect of some Moroccan medicinal plant extracts on human cervical cell lines. *Journal of Medicinal Plant Research*, 3(12), 1045-1050.
- Messaoudi, M., Chahmi, N., El Mzibri, M., Gmouh, S., Amzazi, S., Benbacer, L., & El Hassouni, M. (2016).** Cytotoxic Effect and Chemical Composition of Inula viscosa from Three Different Regions of Morocco. *European Journal of Medicinal Plants*, 16(4), 1-9.
- Mosmann, T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63.
- Muhammad, I., Takamatsu, S., Mossa, J. S., El-Ferally, F. S., Walker, L. A., & Clark, A. M. (2003).** Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Centaurothamnus maximus* and *Vicoapentanema*. *Phytotherapy Research*, 17, 168–173.
- Mustapha, N., Bouhlel, I., Chaabane, F., Bzéouich, I. M., Ghedira, K., Hennebelle, T., & Chekir-Ghedira, L. (2014).** Aqueous extract of *Crataegus azarolus* protects against DNA damage in human lymphoblast Cell K562 and enhances antioxidant activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), 2266–2275.
- Niki, E. (1997).** Free radicals, antioxidants, and cancer. In: Ohgashi, H., Osawa, T., Terao, J., Watanabe, S., Yoshikawa, T.(Eds.), *Food Factors for Cancer Prevention*. Springer, Tokyo, 55–57.
- Nossoni, F. (2008).** Single-cell gel electrophoresis (comet assay), methodology, potential applications, and limitations in cancer research. *Basic Biotechnology eJournal*, 4, 30-35.
- Oran, S., & Al-Eisawi, D. M. H. (2015).** Ethnobotanical survey of the medicinal plants in the central mountains (North-South) in Jordan. *Journal of Biodiversity and Environmental Science*, 6(3), 381-400.
- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984).** Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.
- Ozkan, E., Pehlivan Karakas, F., Birinci Yildirim A., Tas, I., Eker I., Yavuz, M. Z., & Ucar Turker, A. (2019).** Promising medicinal plant *Inula viscosa* L.: Antiproliferative, antioxidant, antibacterial and phenolic profiles. *Progress in Nutrition*, 21(3), 652-661.
- Patil, S. D. (2013).** A recent review on anticancer herbal drugs. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*, 1, 77–84.

- Popiolkiewicz, J., Polkowski, K., Skierski, J. S., & Mazurek, A. P. (2005).** In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides. *Cancer Letters*, 229(1), 67-75.
- Poulson, H. E., Prieme, H., & Loft, S. (1998).** Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention*, 7(1), 9-16.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008).** Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125-1131.
- Romero-Jiménez, M., Campos-Sánchez, J., Analla, M., Muñoz-Serrano, A., & Alonso-Moraga, A. (2005).** Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutation research*, 585(1-2), 147-155.
- Rozenblat, S., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H., Cohen, Y., & Dovrat, S. (2008).** Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 75, 369-382.
- Sassi, A., Bouhlel, I., Mustapha, N., Mokdad-Bzeouich, I., Chaabane, F., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2016).** Assessment in vitro of the genotoxicity, antigenotoxicity and antioxidant of *Ceratonia siliqua* L. extracts in murine leukaemia cells L1210 by comet assay. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 77, 117–124.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005).** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306.
- Schinella, G. R., Tournier, H. A., Prieto, J. M., Mordujovich, P., & Rios, J. L. (2002).** Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Science*, 70(9), 1023-1033.
- Seca, A. M., Grigore, A., Pinto, D. C., & Silva, A. M. (2014).** The genus *Inula* and their metabolites: from ethnopharmacological to medicinal uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 154, 286-310.
- Shoeb, M. (2008).** Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 1(2), 35-41.
- Singh, N. P., McCoy, M. C., Tice, R., & Schneider, E. L. (1988).** A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- Smith, F. (1951).** Tetrazolium salt. *Science*, 113 (2948), 751-754.
- Talib, W. H., & Mahasneh, A. M. (2010).** Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Scientia Pharmaceutica*, 78(1), 33-45.
- Talib, W. H., Zarga, M. H. A., & Mahasneh, A. M. (2012)** Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*. *Molecules*, 17(3), 3291-3303.

- Taneja, S. C., & Qazi, G. N. (2007).** Bioactive Molecules in Medicinal Plants: A perspective in their therapeutic action. *Drug discovery and development*, Chorghade, M.S., Ed., John Wiley and Sons, Inc, 1-50.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., & Sasaki, Y. F. (2000).** Single cell gel/comet assay, guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Tice, R. R., Andrews, P. W., & Singh, N. P. (1990).** The single cell gel assay, a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Science*, 53, 291-301.
- Velayudhan, S. S., Liora, S., Levana, D., Hussein, M., Hassan, A., Raghda, M., Safaa, A., Alex, M., Serge, Y. L., & Itamar, G. (2017).** Ethanolic extracts of *Inula viscosa*, *Salix alba* and *Quercus calliprinos*, negatively affect the development of the entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* – A model to compare gastro-intestinal nematodes developmental effect. *Journal of Invertebrate Pathology*, 145, 39-44.
- Virdis, P., Migheli, R., Galleri, G., Fancello, S., Cadoni, M. P. L., Pintore, G., Petretto, G. L., Marchesi, I., Fiorentino, F. P., di Francesco, A., Sanges, F., Bagella, L., Muroli, M.R., Fozza, C., Miglio, M. R. D., & Podda, L. (2020).** Antiproliferative and proapoptotic effects of *Inula viscosa* extract on Burkitt lymphoma cell line. *Tumour biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 42(2), 1-9.
- Weyermann, J., Lochmann, D., & Zimmer, A. (2005).** A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288 (2), 369-376.
- Yano, C. L., & Marcondes, M. C. C. G. (2005).** Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(10), 1378-1384.
- Yokuş, B., ve Çakır, D.Ü. (2012).** Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(2) , 7-18.
- Zeggwagh, N. A., Ouahidi, M. L., Lemhadri, A., & Eddouks, M. (2006).** Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 223-227.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001).** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165–5170.
- Zhou, S., Koh, H., Gao, Y., Gong, Z., & Lee, E.J. (2004).** Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. *Life Sciences*, 74, 935 - 968.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : NALAN TAVŞANLI

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2016, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2021, Bursa Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2020-halen İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- TAVSANLI N., TANER G. (2021). Comparison of the cytotoxic effects of *Inula viscosa* methanol and water extracts on normal and cancer human lung cell lines, 1st International Conference on Applied Engineering and Natural Sciences, Konya, Kasım 2021 (Sözlü sunum)